

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung
und Parodontologie der
Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. A. Kröncke

ÜBER DIE SÄUREBILDUNG VERSCHIEDENER STÄMME KARIOGENER STREPTOKOKKEN UNTER DEM EINFLUSS VON CHLORHEXIDIN

Inaugural—Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Michaela Probst-Steinmann, geb. Probst
aus Coburg

1979

10707100

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung
und Parodontologie der
Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. A. Kröncke

ÜBER DIE SÄUREBILDUNG VERSCHIEDENER STÄMME KARIOGENER STREPTOKOKKEN UNTER DEM EINFLUSS VON CHLORHEXIDIN

Inaugural—Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Michaela Probst-Steinmann, geb. Probst
aus Coburg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. A. Kröncke

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 02. 1979

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	6
II. LITERATURÜBERSICHT	8
1. EINGRENZUNG DER THEMATIK	8
2. ALLGEMEINE MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUN- GEN MIT CHLORHEXIDIN	8
3. UNTERSUCHUNGEN AN MUNDHÖHLENBAKTERIEN ...	10
III. MATERIAL UND METHODEN	11
1. WARBURG METHODE	11
1.1. Allgemein	11
1.2. Anwendung	13
2. MIKROBIOLOGIE	13
2.1. Mikroorganismen	13
2.2. Nährmedien	14
2.3. Anzucht und Vorbereitung der Mikroorganismen	14
3. CHEMIKALIEN	15
3.1. Chlorhexidindigluconat	15
3.2. Puffer	15
3.3. Substrat	15
4. VERSUCHE	16
4.1. Anordnung	16
4.2. Durchführung	17
5. FEHLER	17
IV. RESULTATE	19
1. NEBENBEFUNDE (Strep. mutans)	19
1.1. Umsatz ohne Zusatz von Chlorhexidin	19
1.2. pH-Verschiebungen	21
2. STOFFWECHSELHEMMUNG DURCH CHLORHEXIDIN ..	22
2.1. Absolute Werte	22
2.2. Prozentuale Hemmung	23
2.2.1. Zur Auswertung	23
2.2.2. Mittlere prozentuale Hemmung	24
2.2.3. Prozentuale Hemmung zu verschiedenen Zeitpunkten ..	28
3. BEEINFLUSSUNG WEITERER BAKTERIENARTEN	29
4. BEEINFLUSSUNG VON SPEICHEL	31
V. DISKUSSION	32
1. NEBENBEFUNDE	32
1.1. Umsatz ohne Chlorhexidin	32
1.2. Wasserstoffionenkonzentration	32
2. STOFFWECHSELHEMMUNG DURCH CHLORHEXIDIN ..	33
2.1. Vergleich der 11 Strep. mutans-Stämme	33
2.2. Andere Mikroorganismen und Speichel	34
3. ÜBERLEGUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS	34
4. VERSUCH DER ÜBERTRAGUNG IN DIE PRAXIS	38

VI. ZUSAMMENFASSUNG	40
VII. LITERATURVERZEICHNIS	42
VIII. ANHANG	47
1. TABELLEN UND GRAFIKEN	47
2. VERSUCHSPROTOKOLLE	63
3. AUFSTELLUNG DER VERWENDETEN GERÄTE	65
4. STRUKTURFORMEL CHLORHEXIDIN	66

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Kariesprophylaxe stellt im Rahmen der präventiven Zahnheilkunde schon deshalb eines der Hauptprobleme dar, weil von der im Volksmund „Zahnfäule“ genannten Krankheit 98 % der Bevölkerung zivilisierter Länder betroffen sind. Die heute gültige Theorie der Ätiologie der Karies gründet sich auf W. D. Millers Hypothese eines chemisch-parasitären Vorgangs. Daraus geht hervor, daß die sauren Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die der Zahnoberfläche anhaften, für die Auflösung der Apatitstrukturen verantwortlich sind. Eine der Möglichkeiten der Kariesprophylaxe müßte demnach in der Hemmung des Stoffwechsels, d. h. der Säurebildung, bzw. in der Zerstörung der Mikroorganismen bestehen.

Diese Anwendung betreffend wurden innerhalb der letzten Jahre verschiedene Substanzen eingehend untersucht, wobei sich u. a. ein Stoff als besonders geeignet erwies:

das bereits 1954 von G. E. Davies und Mitarbeitern (10) gefundene

1,6-Di-4'-Chlorophenyldiguanidohexan
= Chlorhexidin

eine stark basische, farblose Substanz, die in Form ihrer Salze Verwendung findet, vor allem des wasserlöslichen Digluconats. (Strukturformel siehe Anhang, 4.)

Die Forschergruppe hatte diese Substanz als die wirksamste unter einigen hundert Strukturvarianten eines bakteriostatisch und bakterizid wirksamen Bisbiguanid-Typs isoliert und deren hohe Aktivität gegen ein breites Spektrum von grampositiven und -negativen Mikroorganismen nachgewiesen. Weitere Untersuchungen der darauffolgenden Jahre führten zu einer teilweisen Entschlüsselung der Wirkungsweise, die primär auf einer Störung der Membranpermeabilität beruht, und erbrachten weitere positive Eigenschaften der Substanz:

- hohe Oberflächenaktivität (Oberflächenspannung 32 dyn/cm) (37)
- geringe Toxizität (41)
- keine oder kaum eine Entwicklung resistenter Mutanten (50)

Pilzkulturen erwiesen sich als ebenso empfindlich wie Bakterien, während säurefeste Bazillen, hitzeresistente Sporen und Tierviren nicht beeinflußt wurden (34). Insgesamt zeigte sich Chlorhexidin anderen Desinfektionsmitteln überlegen (34) und fand als solches Eingang in die Medizin.

In der Zahnheilkunde wurde Chlorhexidin erstmals 1959 zur Desinfektion der Einstichstelle bei der Lokalanästhesie zur Verwendung empfohlen (7). Bereits 1962 berichteten H. E. Schröder und Mitarbeiter über die plaque- bzw. zahnsteinhemmende Wirkung der Substanz, die dort die Bezeichnung Z7y trug (56).

Auch diese Anwendung betreffend erwies sich Chlorhexidin vergleichbaren Substanzen überlegen (20).

Die **plaqueinhibierende Wirkung** wurde seitdem in zahlreichen, teilweise jahrelangen Versuchsreihen in vivo und in vitro (siehe II.) bestätigt, auf mögliche Nebenwirkungen untersucht sowie nach dem zugrunde liegenden Mechanismus geforscht. Die Wirksamkeit steigt mit steigender Konzentration der Substanz und beruht auf zwei verschiedenen gemeinsam wirksamen Mechanismen (46):

- der antibakteriellen Wirkung gegenüber den kariogenen Mikroorganismen
- der hohen Affinität zu Plaques, Hydroxylapatit, Speichelproteinen und anderen Strukturen der Mundhöhle, die, begünstigt durch die Oberflächenaktivität, zur Adsorption führt und sowohl eine Depotwirkung bedingt als auch Entstehung und Struktur der Plaques verändert.

Eine zentrale Bedeutung für Plaquebildung und Kariesentwicklung kommt nach neueren Untersuchungsergebnissen (6, 16, 21) der Kariesforschung den **Streptokokken** der Plaques zu und das aus verschiedenen Gründen:

- Streptokokken herrschen unter den Erstbesiedlern vorher gereinigter Zahnoberflächen vor
- ihr prozentuales Vorkommen in der Plaqueflora ist relativ hoch
- viele Arten weisen ein besonders hohes und schnelles Säurebildungsvermögen auf
- viele Arten sind zur Bildung von Intrazellulären Polysacchariden als Kohlenhydratreserven befähigt
- und viele Arten bilden Extrazelluläre Polysaccharide, die mit Speichelkomponenten unlösliche, fest an der Zahnoberfläche haftende Komplexe bilden, die für den Aufbau der Plaques verantwortlich sind;

Untersuchungen von E. und B. Ranke (44) zeigten, daß **Streptokokken der mutans-Reihe** besonders kariogen wirken. Streptokokkus mutans-Stämme zeigten das mit Abstand höchste Säurebildungsvermögen und waren in allen Fällen zur Bildung von IPS und EPS fähig. Außerdem scheinen sie ein sehr hohes Durchsetzungsvermögen gegenüber einer bereits etablierten Mundflora zu besitzen (siehe auch 14, 18).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war, die Hemmung der Stoffwechselaktivität von Reinkulturen verschiedener Stämme der Art Streptokokkus mutans in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Chlorhexidindigluconat zu untersuchen, zu vergleichen und die für eine Hemmung des Stoffwechsels notwendigen Konzentrationen zu ermitteln. Daneben wurden, um direkte Vergleiche mit ähnlichen Arbeiten zu ermöglichen, vier weitere Bakterienarten sowie, um die Anwendbarkeit der gefundenen Werte auf die Verhältnisse in der Mundhöhle zu prüfen, menschlicher Nüchternspeichel mit dem Hemmstoff behandelt.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. EINGRENZUNG DER THEMATIK

Seit der ersten Beschreibung durch G. E. Davies und Mitarbeiter im Jahre 1954 (10) weist die Substanz Chlorhexidin eine äußerst umfassende Bibliographie auf. Allein auf dem Gebiet der oralen Präventivmedizin sind ungefähr 200 Arbeiten darüber erschienen, die sich u. a. mit folgenden Problemen befassen: bakteriostatische und bakterizide Wirksamkeit, Verwendungszwecke und Applikationsformen, Dosierung, Affinität zu bestimmten Substraten bzw. Geweben, Akkumulation im Gewebe, Toxizität, Sensibilitätsminderung bzw. Resistenz sowie den Gesamtergebnissen klinischer Versuchsreihen.

Ziel der vorliegenden Übersicht kann und soll kein Überblick über alle diese Arbeiten sein. Dazu sei auf gesondert erschienene zusammenfassende Veröffentlichungen hingewiesen: die dreiteilige, deutschsprachige Literaturübersicht von H. Ochsenbein zum Thema „Chlorhexidin in der Zahnheilkunde“ (41, 42, 43), drei englischsprachige Arbeiten von Hirst (27), Löe (35) und Gjermo (19), sowie die Kurzfassungen der Vorträge des Symposiums über Chlorhexidin, das im September 1972 in Göteborg abgehalten wurde (57). Ziel dieser Übersicht soll vielmehr eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse einiger Arbeiten sein, die sich wie die vorliegende Untersuchung allein mit den Wirkungen von Chlorhexidin auf Mikroorganismen bzw. deren Stoffwechsel befassen.

2. ALLGEMEINE MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT CHLORHEXIDIN

Die wohl umfassendsten Untersuchungen dieser Art stammen von W. B. Hugo und A. R. Longworth aus den Jahren 1964—66 (28—31, 37). Sie wiesen mittels spektrophotometrischer Messungen nach, daß die Zugabe von Chlorhexidin zu einer Suspension von *E. coli* sofort zu einer Adsorption von Chlorhexidinmolekülen an die Bakterienoberfläche führt, bedingt durch deren negative Ladungen und das kationische Verhalten des Hemmstoffs. Die Adsorption zeigt Sättigungskinetik, die adsorbierte Menge steigt mit der Konzentration an Chlorhexidin sowie mit steigendem pH und ist abhängig von der Dichte der Suspension und der Bakterienart. Die bakteriostatische bzw. bakterizide Wirksamkeit nimmt mit der adsorbierten Menge zu.

Das Verhalten der Mikroorganismen unter dem Einfluß des Hemmstoffs läßt sich anhand dieser und anderer übereinstimmender Untersuchungen (Davies, Bentley und Field (8), Hennessey (24), Davies (9) wie folgt vereinfacht zusammenfassen.

Bereits in Anwesenheit extrem niedriger Konzentrationen an Chlorhexidin tritt als Folge der Adsorption Bakteriostase ein (ab $0,2 \mu\text{g/ml}$), ohne daß (elektronenmikroskopisch) sichtbare Veränderungen an den Zellen hervorgerufen werden. Konzentrationen ab $1\text{—}10 \mu\text{g/ml}$ bewirken eine

sichtbare Desorganisation der Zellmembranen und führen zum Austritt von Cytoplasmabestandteilen (Maximum bei 60—90 $\mu\text{g/ml}$). Höhere Konzentrationen dagegen ($> 150 \mu\text{g/ml}$) zerstören die Membran soweit, daß eindringendes Chlorhexidin das Cytoplasma präzipitiert. Während die Zellen im ersten Fall elektronenmikroskopisch leer und die Membranen teilweise zerrissen erscheinen, entstehen dann granulierte, elektronendichte, eckige Partikel. Bakterizide Wirkung läßt sich erst bei Konzentrationen beobachten, die zu einer Präzipitation des Cytoplasmas führen, wodurch eine Reparatur der Zellen verhindert wird (14). Die Ausfällung erfolgt umso schneller und vollständiger, je höher die Konzentration.

Die folgenden Einzelergebnisse verschiedener Untersuchungen erscheinen außerdem wichtig.

Chlorhexidin führt nach Hugo und Longworth (30) nicht zur Lyse isolierter Zellwände, wohl aber zur Präzipitation zellfreien Cytoplasmas.

G. E. Davies und Mitarbeiter (10) beschreiben in ihrer bereits erwähnten grundlegenden Arbeit u. a. die Tatsache, daß bei Steigerung der Hemmstoffkonzentration meist eine scharfe Grenze zwischen vollem Wachstum und totaler Wachstumshemmung besteht („Schwellenkonzentration“), und daß bereits verhältnismäßig niedrige Konzentrationen ausreichen, den weit überwiegenden Teil der behandelten Mikroorganismen abzutöten, daß aber wesentlich höhere Konzentrationen notwendig sind, alle Mikroorganismen zu erfassen.

Maßgebend für die Wirksamkeit ist in jedem Fall nicht die absolute Konzentration an Hemmstoff, sondern die Konzentration im Verhältnis zur Bakteriendichte, da die Wirkung von der von der einzelnen Zelle adsorbierten Menge an Chlorhexidin abhängt (8).

Als weitere beeinflussende Faktoren kommen in Frage: die Anwesenheit biologischer Flüssigkeiten (Hennessey (24)) sowie das Vorhandensein anzuichtbedingter Schutzschichten aus extrazellulären Polysacchariden (A. Davies (9)).

Die Minderung der Sensibilität der Mikroorganismen gegenüber dem Hemmstoff beschrieb T. D. Hennessey (24) nach bis zu vierzig in vitro-Passagen als sehr gering. Bentley (2) führt die Resistenz einiger Arten von *Pseudomonas* auf eine Nicht-Adsorption durch einzelne Zellen, nicht aber auf eine größere Resistenz gegen Lyse und Koagulation zurück, da die Anzüchtung der überlebenden Mikroorganismen eine Kultur der alten Zusammensetzung lieferte.

3. UNTERSUCHUNGEN AN MUNDHÖHLENBAKTERIEN

Die inzwischen erzielten klinischen Erfolge von Loe (36), R. M. Davies (11), Cancro (5), Flötra (15) u. a. bei der Reduzierung bzw. Veränderung von Plaques durch Chlorhexidin führten zu einer Reihe von Untersuchungen, die sich unter Laborbedingungen mit der Wirkung von Chlorhexidin speziell auf Mundhöhlenbakterien befassen.

S. G. Hesselgren, C. M. Dahl und Mitarbeiter kommen in ihrer 1971 veröffentlichten Untersuchung (25), die bakterizide Wirkung betreffend, zu mit bereits erwähnten Berichten gut übereinstimmenden Ergebnissen. Unterhalb einer Schwellenkonzentration an Hemmstoff beobachten sie kaum eine Wirkung, darüber exponentiellen Verlauf. Einwirkungszeit und Temperatur scheinen kaum einen Einfluß auf die Wirksamkeit zu haben, wohl aber das pH. Eine weitere 1972 veröffentlichte Untersuchung der Autoren (26) bestätigt, daß die Schwellenkonzentration in Anwesenheit von Speichel wesentlich höher liegt und daß Plaquesmikroorganismen weniger empfindlich gegenüber Chlorhexidin sind als solche aus Reinkulturen.

M. Kalowski und A. Kediza (32) untersuchten die Empfindlichkeit von 111 Stämmen EPS-produzierender Streptokokken gegenüber dem Wirkstoff. 90 % der Stämme wurden durch 4 $\mu\text{g/ml}$ im Wachstum gehemmt, kein Stamm war resistent gegen 32 $\mu\text{g/ml}$. Es bestanden jedoch Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten.

Eine nahezu vollständige Hemmung der Säurebildung kariogener Streptokokken erreichte H. Luoma (38) durch Gaben einer Lösung aus 50 ppm Chlorhexidin plus 50 ppm Fluorid. Eine Vorbehandlung mit alleine 12,5 ppm (= 12,5 $\mu\text{g/ml}$) Chlorhexidin erbrachte bereits eine mehr als 50 %ige Reduktion.

Einige weitere Laboruntersuchungen befaßten sich mit Mikroorganismen, die aus Speichel und Plaques von Personen stammten, welche über eine bestimmte Zeit Chlorhexidin appliziert bekommen hatten. In allen Fällen war es zu einer starken Reduktion der in der Mundhöhle befindlichen Keime sowie zu einer Veränderung der Plaques gekommen. Offen blieb dabei das Problem der Sensibilitätsminderung bzw. der Entwicklung resistenter Mutanten. C. R. Schiött (48—52), C. G. Emilson (12, 13) und andere wiesen, wenn auch nicht ganz übereinstimmend, nach, daß immer eine leichte Minderung der Sensibilität der Mikroorganismen eintritt gegenüber solchen aus einer Kontrollgruppe bzw. aus Reinkulturen. Es ergab sich außerdem eine leichte Verschiebung der Mundhöhlenflora in Richtung der weniger empfindlichen Keime.

Sämtliche Autoren betrachten jedoch die Veränderungen in der Ökologie der Mundhöhlenflora wie auch sämtliche anderen beobachteten Nebenwirkungen als gering und bei zwingender Indikation als zu vernachlässigen.

III. MATERIAL UND METHODEN

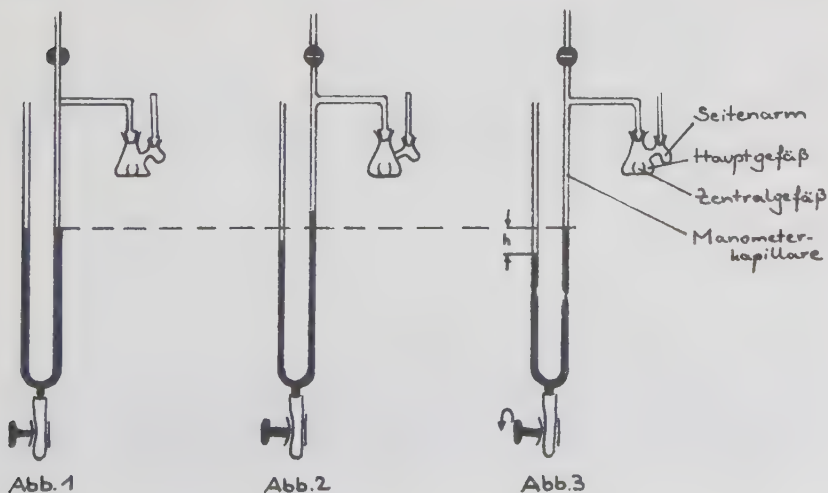
1. WARBURG METHODE

1.1. Allgemein

Chemische oder biologische Reaktionen wie z. B. der Stoffwechsel von Mikroorganismen sind häufig mit einem Gasaustausch verbunden. Die dabei verbrauchte oder entstandene Gasmenge ermöglicht die quantitative Erfassung derartiger Vorgänge.

Auf dieser Überlegung beruht die von dem Physiologen und Nobelpreisträger Otto H. Warburg entwickelte manometrische Methode (33, 58), mit deren Hilfe er den Ablauf solcher Reaktionen in einem geschlossenen System anhand der im System auftretenden Druckänderungen beobachtete.

Das verwendete Reaktionssystem besteht aus einem Reaktionsgefäß, das mit einem sog. Warburg-Manometer verbunden ist (s. Abb. 1). Das Reaktionsgefäß stellt ein geschlossenes System dar, dessen Volumen durch den Meniskus der Flüssigkeitssäule in der einen Manometerkapillare abgeschlossen ist. Auf der anderen Kapillare lastet Atmosphärendruck. Zu Versuchsbeginn muß der Stand beider Flüssigkeitssäulen protokolliert werden. Eine Volumenänderung im Reaktionsgefäß während des Versuchs führt dann zu einer Druckdifferenz zwischen Reaktionssystem und Außendruck, d. h. zu einer Verschiebung der Flüssigkeitssäulen (s. Abb. 2). Stellt man jetzt mit Hilfe eines am unteren Manometerende befindlichen Quetschschlauches die Flüssigkeitssäule auf den Anfangswert zurück, und damit das Ausgangsvolumen im Reaktionsgefäß wieder her, so stellt die Verschiebung der Flüssigkeitssäule im offenen Schenkel ein Maß für die Druckänderung dar (s. Abb. 3).



Um zu verhindern, daß Schwankungen des äußeren Luftdrucks bzw. Temperaturschwankungen des verwendeten Thermostatenbads die Ergebnisse verfälschen, läßt man bei jedem Versuch ein mit der entsprechenden Menge aqua dest gefülltes Reaktionsgefäß plus Manometer mitlaufen, das sog. Thermobarometer. Die hier abgelesenen Schwankungen dienen dann der Korrektur der Meßwerte.

Für die „korrigierte manometrische Differenz“ gilt demnach:

$$h = (h_t - h_0) - (b_t - b_0)$$

mit h_t und h_0 als Manometeranzeigen in mm zur Zeit t bzw. zu Versuchsbeginn

und b_t und b_0 als Anzeigen des Thermobarometers zu den entsprechenden Zeiten.

Bei Gasentwicklung ist h positiv, bei Gasverbrauch negativ.

Die entstandene bzw. verbrauchte Gasmenge berechnet sich dann als

$$x(\mu l) = K \cdot h(\text{mm}) \quad \text{mit}$$

h = korrigierte Druckdifferenz in mm

K = Konstante, die sämtliche den jeweiligen Versuchsbedingungen zugeordneten Parameter einschließt.

Folgende Parameter gehen in die Berechnung dieser Konstanten ein:

$V_g(\mu l)$ Gasvolumen im Reaktionsgefäß einschließlich Volumen der mit dem Gefäß verbundenen Manometerkapillare bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit

$V_f(\mu l)$ Volumen der in das Reaktionsgefäß eingefüllten Flüssigkeitsmenge

$P_0(\text{mm Sperrflüssigkeitssäule})$ Normaldruck

$T(^{\circ}\text{K})$ Temperatur im Reaktionssystem

$\alpha(\text{ml/ml})$ Bunsenscher Absorptionskoeffizient als Maß für die Löslichkeit des entwickelten oder verbrauchten Gases in der im Reaktionsgefäß befindlichen Flüssigkeit (gültig für Normaldruck und eine bestimmte Temperatur)

Es gilt:

$$K = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \cdot \alpha}{P_0} (\mu l/\text{mm})$$

Um eine gute Durchmischung der Flüssigkeit und günstige Bedingungen für den Gasaustausch zu schaffen, werden die Reaktionsgefäße im Wasserbad mit einer den Versuchsbedingungen angepaßten Frequenz und Amplitude geschüttelt.

1.2. Anwendung

Im vorliegenden Fall erwies sich die Warburg-Methode als geeignet zur Beobachtung des Stoffwechsels von Mikroorganismen unter dem Einfluß eines Hemmstoffs.

Beim größten Teil der Versuche geschah das anhand der von den Mikroorganismen gebildeten Säuren, die aus einem im Reaktionsgefäß befindlichen Bicarbonatpuffer stöchiometrisch CO_2 freisetzen. Das für diese Mikroorganismen notwendige anaerobe Milieu wurde durch ein zehnminütiges Begasen mit einem Gemisch aus 95 % N_2 und 5 % CO_2 hergestellt. Erst dann wurden die Reaktionssysteme geschlossen und mit Versuchsbeginn, d. h. direkt vor dem Einkippen von Substrat und Hemmstoff aus dem Seitenarm in das Reaktionsgefäß, die Manometer abgelesen. (Anaerobe Versuchsdurchführung)

Bei den restlichen Versuchen diente der Verbrauch von O_2 als Maß für den Umsatz. Zur Bindung des dabei entstehenden CO_2 befand sich Natronlauge im Zentralgefäß. Hier war kein Begasen notwendig, das Reaktionsgefäß enthielt Luft. (Aerobe Versuchsdurchführung)

Für sämtliche Versuche fand jeweils die gleiche Kombination von Manometer und Reaktionsgefäß Verwendung, so daß die für die jeweilige Paarung gültige Konstante nur je einmal für CO_2 und O_2 berechnet werden mußte. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen bei Angabe der Volumina in ml berechnen sich die Konstanten folgendermaßen:

$$\text{für } K_{\text{CO}_2} = ((V_{\text{Gef.}} + V_{\text{Man.}} - 2,5) \cdot 0,088 + 0,142) \mu\text{l/mm}$$

$$K_{\text{O}_2} = ((V_{\text{Gef.}} + V_{\text{Man.}} - 2,8) \cdot 0,088 + 0,007) \mu\text{l/mm}$$

$$\text{für } T = 37^\circ \text{C} = 310^\circ \text{K}$$

$$p = 760 \text{ mm Hg} = 10\,000 \text{ m Sperrflüssigkeitssäule}$$

$$V_f \text{ CO}_2 = 2,5 \text{ ml}$$

$$V_f \text{ O}_2 = 2,8 \text{ ml}$$

$$\alpha_{\text{CO}_2} = 0,5670$$

$$\alpha_{\text{O}_2} = 0,0239$$

Die Schüttelfrequenz betrug 110 min^{-1} , die Amplitude 5 cm.

2. MIKROBIOLOGIE

2.1. Mikroorganismen

Bei den verwendeten Bakterien der Art *Streptokokkus mutans* handelt es sich um Reinkulturen von elf Stämmen unterschiedlicher serologischer Eingruppierung und verschiedener Herkunft (s. Tab. 6).

Daneben wurde je ein Normstamm der Arten *Escherichia coli*, *Staphylokokkus aureus*, *Candida albicans* und *Streptokokkus salivarius* untersucht, sowie menschlicher Nüchternspeichel eines Probanden, ohne Stimulation gewonnen (s. Tab. 7).

Die Streptokokken lagen in Form von Stichkulturen vor, die restlichen verwendeten Mikroorganismen auf Blutplatten.

2.2. Nährmedien

Stichkulturen:	Thioglykolat-Nährboden	Merck Art. 8191
Blutagarplatten:	Firma Biotest	
Flüssigkulturen:		
Bacto Tryptose	20 g	Difco 0124—01
Hefe Extrakt	4 g	Difco 0127—01
Kochsalz	2,5 g	Merck Art. 6404
L-Cystin	50 mg	Difco 0184—15
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5 g	Merck Art. 6580
Natriumhydrogenphosphat	0,6 g	Merck Art. 6346
Glucose	10 g	Merck Art. 8342

Vorstehende Substanzen wurden mit aqua bidest aufgefüllt auf 1 l, 20 min bei ca. 80—90° Celsius mittels eines Magnetrührsystems gemischt, um die Bestandteile rückstandslos zu lösen, in Flaschen von je ca. 80 ml abgefüllt und im Autoklaven sterilisiert (15 min bei 120° und 1 atü).

2.3. Anzucht und Vorbereitung der Mikroorganismen

Um ein sicheres Anwachsen der Mikroorganismen in der Flüssigkultur zu erreichen, wurden die in Form von Stichkulturen vorliegenden Arten (Streptokokken) auf Blutagarplatten überimpft und von da weiterverarbeitet. Die Inkubation der Blutagarplatten erfolgte für 24 h bei 37° Celsius unter anaeroben Bedingungen im Gaspak-Topf, dann für weitere 24 h unter aeroben Bedingungen, die Aufbewahrung nach erfolgreicher Bebrütung im Kühlschrank bei 4° Celsius. Bei Bedarf wurden dann pro Durchgang zwei Flaschen Flüssignährmedium von derselben Blutplatte mit je einer Öse Bakterienmaterial beimpft und ca. 18 h bei 37° Celsius inkubiert.

Mit Versuchsbeginn konnte die so gewonnene Flüssigkultur 10 min bei 4 000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Mikroorganismen anschließend zweimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen werden.

Um für alle Versuche eine reproduzierbare Dichte der Bakteriensuspension zu erhalten, wurden die Mikroorganismen dann erneut in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, die Suspension mit Hilfe eines Magnetrührsystems homogenisiert und solange verdünnt, bis sie bei 620 nm eine Transmission von 0,1 aufwies, bezogen auf physiologische Kochsalzlösung.

Der Wert $T = 0,1$ erwies sich insofern als günstig, als der Abbau der vorhandenen Glucose in einem für den Versuch günstigen Zeitraum ablief. Bei höheren Transmissionen war der Umsatz im Beobachtungszeitraum so gering und bei niedrigeren Transmissionen der Beobachtungszeit-

raum bis zum Abbau der gesamten Glucose so kurz, daß die Fehler zu stark eingingen. (Beobachtet am Streptokokkus mutans-Stamm 441 bei Transmissionen von $T = 0,01, 0,1, 0,7$).

Die Homogenisierung der Suspension wurde an zwei Stichproben (Stamm 441 und C 67/1) mit Hilfe von nach Gram gefärbten Präparaten im Lichtmikroskop überprüft und für ausreichend befunden.

3. CHEMIKALIEN

3.1. Chlorhexidindigluconat

Stammlösung: Chlorhexidindigluconatlösung*), 20 Vol. %

Dafür gilt: 20 Vol. % $\approx$ 18,5 Gew. % (spezifisches Gewicht der 20%igen Lösung: 1,072 g/ml (55)).

In Vorversuchen wurde der für die Untersuchung geeignete Konzentrationsbereich bestimmt und durch Verdünnung mit aqua bidest folgende Konzentrationsstufen gewonnen:

5, 10, 50, 100, 150, 250, 750, 1000, 5000, 10 000, 20 000 $\mu\text{g/ml}$, die dann im endgültigen Versuchsansatz nochmal zehnfach verdünnt wurden (s. III. 4.1.).

3.2. Puffer

Für sämtliche anaeroben Versuche fand ein 1/50 molarer Bicarbonatpuffer mit pH 8,3 Verwendung (Fehlerbreite $\pm 0,1$).

(Einwaage: 197 mg Natriumhydrogencarbonat Merck Art. 6325 auf 100 ml H_2O)

Für sämtliche aeroben Versuche wurde ein 1/10 molarer Veronalpuffer mit pH 6,9 verwendet.

(Einwaage: 2,062 g Barbitol-Natrium Merck Art. 6318 auf 100 ml H_2O ; 53,6 ml davon mit 0,1 n HCl auf 100 ml aufgefüllt)

3.3 Substrat

Als Substrat diente eine 1/25 molare Glucoselösung;

(Einwaage: 0,792 g Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ MG 198,17 (Merck Art. 8342) auf 100 ml)

das entspricht einer Konzentration von m/250 im Ansatz.

*) Dieses Material wurde uns dankenswerter Weise von der Fa. Blendax, Mainz, zur Verfügung gestellt.

4. VERSUCHE

4.1. Anordnung

Der für sämtliche Versuche verwendete Warburg-Apparat ermöglicht die gleichzeitige Beobachtung von 13 verschiedenen Versuchsansätzen. Pro Versuchsdurchgang wurde der Stoffwechsel jeweils eines Stammes untersucht, wobei unter sonst gleichen Bedingungen in den 13 Ansätzen nur die Konzentration an Chlorhexidindigluconat variierte. Das ergab folgende Anordnung:

Gefäß Nr. 1 Thermobarometer: 2,5 bzw. 2,8 ml aqua dest

Gefäße Nr. 2 und 14 Referenzmeßgläser: aqua bidest an Stelle von Chlorhexidin

Gefäße Nr. 3 — 13 Meßgläser: Chlorhexidinlösung in steigender Konzentration

Es fanden im vorliegenden Fall kleine, kegelförmige Warburggefäße mit Seitenarm und Zentralgefäß für 2,5 ml (anaerob) bzw. 2,8 ml (aerob) Versuchsansatz Verwendung.

In die Gefäße wurde einpipettiert:

— **Anaerobe Versuchsdurchführung**

1 ml Bakteriensuspension $T = 0,1$

1 ml Bicarbonatpuffer m/50 pH 8,3

0,25 ml Glucoselösung m/25

0,25 ml Chlorhexidinlösung bzw. aqua bidest

im Hauptgefäß

im Seitenarm

— **Aerobe Versuchsdurchführung**

1 ml Bakteriensuspension $T = 0,1$

1 ml Veronalpuffer m/10 pH 6,9

0,25 ml Glucoselösung m/25

0,25 ml Chlorhexidinlösung bzw. aqua bidest

0,3 ml NaOH 10 %

im Hauptgefäß

im Seitenarm

im Zentralgefäß

Durch die Verdünnung im Ansatz ergaben sich folgende zwölf wirksamen Konzentrationsstufen an Chlorhexidindigluconat:

0,5; 1; 5; 10; 15; 25; 75; 100; 500; 1000; 2000 $\mu\text{g/ml}$

Die Glucoseeinwaage betrug 10 μMol (0,25 ml m/25 Lösung), daraus kann

- **im anaeroben Versuch** (Energiegewinnung durch Gärung) unter der Voraussetzung, daß pro Mol Glucose 2 Mol Milchsäure entstehen (22), maximal ein Volumen von 448 μl CO_2 freigesetzt werden; entstehen auf anderen Abbauwegen saure Stoffwechselprodukte mit niedrigerem MG, kann entsprechend mehr CO_2 gebildet werden (E. coli, Speichel);

- **im aeroben Versuch** (Energiegewinnung durch Atmung) unter der Voraussetzung, daß zum aeroben Abbau von einem Mol Glucose sechs Mol O_2 verbraucht werden (53), theoretisch maximal ein Verbrauch von 1344 μl O_2 resultieren.

4.2. Durchführung

Jeder Bakterienstamm wurde in zwei, bei erheblichen Abweichungen in drei Durchgängen beobachtet. Es ergaben sich für die Streptokokken der mutans-Reihe insgesamt 25 Durchgänge, für die restlichen Mikroorganismen weitere 10.

Die Untersuchung beider Streptokokkenarten, die von *E. coli* sowie die des menschlichen Speichels erfolgte unter anaeroben Bedingungen, die von *Staph. aureus* und *Cand. albicans* unter aeroben.

Die Versuchsdauer erstreckte sich über maximal 180 min, beginnend mit dem Einkippen von Hemmstoff und Substrat aus dem Seitenarm in das Hauptgefäß. Das Einkippen und jedes Ablesen der Manometer begann jeweils mit den Gefäßen Nr. 14. und 1 und verlief in aufsteigender Reihe. War die angebotene Substratmenge bereits nach weniger als 180 min verbraucht, endete der Versuch nach Abschluß der linearen Phase der Umsatzkurve.

Der Manometerstand wurde innerhalb der ersten Stunde alle 15 min, dann alle 30 min abgelesen und tabelliert.

Zur Überprüfung, ob die Pufferkapazität ausreichte, die Ansäuerung durch das Begasen mit CO_2 und die sauren Stoffwechselprodukte abzufangen, diente die Messung des pH der Ansätze einiger Durchgänge vor und nach dem Versuch in Form von Stichproben.

5. FEHLER

Die Fehlermöglichkeiten der beschriebenen Methode lassen sich grundsätzlich in zwei Bereiche unterteilen:

A) Fehler, die alle Ansätze eines Durchgangs betreffen:

- Ungenauigkeiten beim Einstellen der Transmission der Bakteriensuspension ($\pm 0,01$ bis max. 0,02);
- Fehler beim Einwiegen bzw. Einstellen der Konzentrationen der verwendeten Chemikalien (zu vernachlässigen);

Die Auswirkungen von Schwankungen der Dichte der Bakteriensuspension wurden wie folgt überprüft: ein Durchgang mit Suspensionen (Stamm 441) drei verschiedener Dichten ($T = 0,01; 0,1; 0,7$) in Anwesenheit von jeweils 0 und 15 $\mu g/ml$ Chlorhexidin ergab die in Abb. 4 aufgezeigten Werte.

Daraus leitet sich ab:

Schwankungen der Transmission um $\pm 0,01$ um den Wert $T = 0,1$ ergeben Abweichungen der mittleren prozentualen Hemmung (s. IV. 3.2.2.) von $\pm 4 \%$, Schwankungen um $\pm 0,02$ von $\pm 6 \%$.

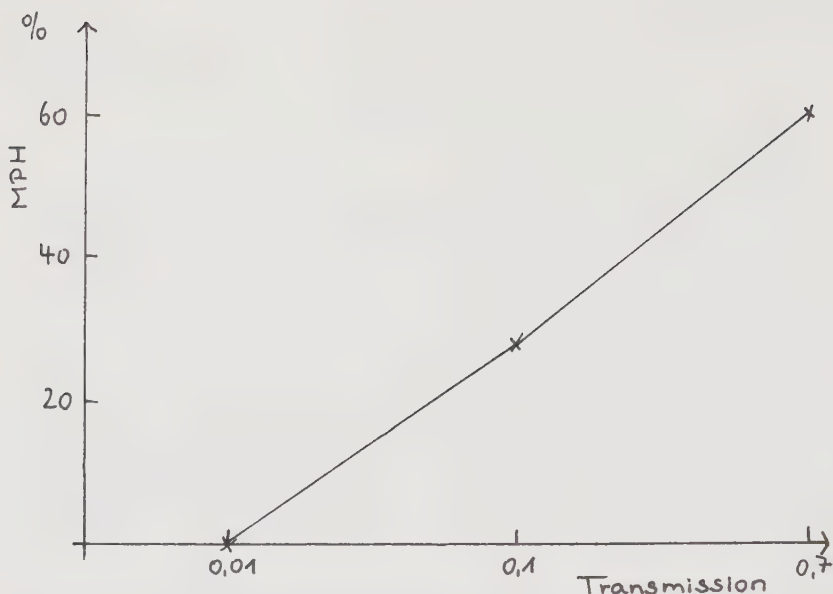


Abb. 4 Mittlere prozentuale Hemmung bei 15 $\mu\text{g/ml}$ für verschiedene Transmissionen (Stamm 441)

B) Fehler, die die einzelnen Ansätze eines Durchgangs betreffen:

- Ungenauigkeiten beim Einpipettieren der verschiedenen Lösungen
- ungleiche Zeitintervalle zwischen dem Schließen, Ablesen und Einkippen der verschiedenen Ansätze
- eventuelle Inhomogenität der Bakteriensuspension

Die Auswirkung dieser Fehler war mit Hilfe eines Durchgangs mit 13 gleichen Ansätzen ohne Zusatz von Chlorhexidin abzuschätzen (Stamm 441).

Es ergaben sich für die 30 min-Werte bei einem Mittelwert von gebildeten 97 $\mu\text{l CO}_2$ eine durchschnittliche Abweichung von $\pm 3,8 \mu\text{l}$, d. h. 4 %, und für die 120 min-Werte bei einem Mittelwert von 359 $\mu\text{l CO}_2$ eine durchschnittliche Abweichung um $\pm 7 \mu\text{l}$, d. h. 2 %.

Damit liegen sämtliche faßbaren Fehler noch unterhalb der für biologische Reaktionen üblicherweise angenommenen Fehlerbreite von min. 10 %.

IV. RESULTATE

1. NEBENBEFUNDE (Strep. mutans)

1.1. Umsatz ohne Zusatz von Chlorhexidin

Die Bildung von CO_2 erfolgte, solange ausreichend Substrat vorhanden war, nahezu konstant über die Zeit (s. Abb. 5). Im Durchschnitt wurden im Versuchszeitraum $309 \mu\text{l CO}_2$ gebildet, d. h. knapp $\frac{3}{4}$ der angebotenen Glucose zu Milchsäure umgesetzt. Die Umsatzgeschwindigkeit war jedoch von Stamm zu Stamm wie auch von Durchgang zu Durchgang starken Schwankungen unterworfen.

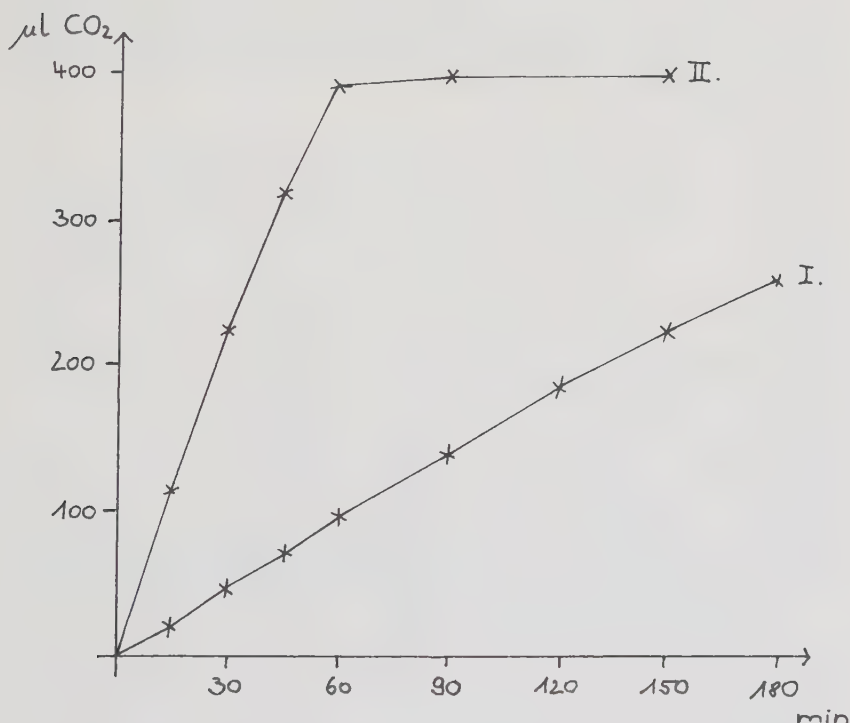


Abb. 5 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes ohne Zusatz von Hemmstoff = „Umsatzkurve“

Beispiel: Stamm 441, I. und II. Durchgang

(I. Durchgang: lineare Phase > 180')

II. Durchgang: lineare Phase = 60')

Aus den in Tab. 1 aufgeführten Einzelwerten für Umsatz und Umsatzgeschwindigkeit ergibt sich zusammenfassend: in 8 der 25 Durchgänge

kam der Umsatz im Versuchszeitraum zum Stehen, weil alles angebotene Substrat verbraucht war. Der lineare Bereich der Umsatzkurve war teilweise bereits nach 60 min beendet, danach wurden noch maximal $66 \mu\text{l CO}_2$ gebildet. Im Durchschnitt dieser Durchgänge waren bei Stillstand $410 \mu\text{l CO}_2$ entstanden, d. h. 91,5 % der theoretisch maximal erreichbaren Menge.

Der „schnellste“ Stamm bildete im Mittel $6,8 \mu\text{l CO}_2$ pro Minute (Stamm T3/53, 2. Durchgang). Der geringste im Versuchszeitraum (180 min) erreichte Umsatz ergab eine CO_2 -Menge von $102 \mu\text{l}$, das entspricht durchschnittlich $0,7 \mu\text{l CO}_2/\text{min}$ (Stamm 626, 2. Durchgang). Die restlichen Durchgänge verteilten sich relativ gleichmäßig zwischen den genannten Extremwerten. Dabei wiesen die verschiedenen Durchgänge jeweils ein- und desselben Stammes keine besondere Übereinstimmung auf. Abgesehen wurde von zwei Durchgängen, bei denen überhaupt kein meßbarer Umsatz stattgefunden hatte (Stamm 634, 2. und 3. Durchgang).

Stamm	I. Durchgang		II. Durchgang		III. Durchgang	
	$\mu\text{l}/\text{min}$	μl	$\mu\text{l}/\text{min}$	μl	$\mu\text{l}/\text{min}$	μl
626	1,8	331	0,6	102	4,1	374 ⁺
634	0,7	135	1,4	256	3,2	381 ⁺
638	1,5	271	1,1	204		
249	4,1	369 ⁺	1,0	131	4,8	432 ⁺
C2/21	6,0	363 ⁺	1,8	326		
T3/52	1,7	313	1,5	261		
T3/53	1,0	181	6,8	406 ⁺		
T5/13	1,2	218	1,6	295		
T3/67	2,1	384	2,5	369		
441	1,4	258	6,5	391 ⁺		
C67/1	1,9	333	2,0	355		

Tab. 1 Umsatzgeschwindigkeit (linke Spalte) und Umsatz (rechte Spalte) am Ende der linearen Phase (+) bzw. nach 180 min, gemessen am gebildeten CO_2 ;

1.2. pH-Verschiebungen

Der pH-Wert des Bicarbonatpuffers lag bei 8,3, der pH-Wert der Ansätze vor dem Begasen, d. h. vor Versuchsbeginn, betrug nach Zugabe der stark sauren Bakteriensuspension (pH 5), der Chlorhexidinlösung (pH 6,3) und der Glucose pH $7,75 \pm 0,1$.

Nach Abschluß des Versuchs differierte der pH-Wert der Ansätze eines Durchgangs um $0,25 - 0,95$. Dort, wo eine nahezu vollständige Stoffwechselhemmung stattgefunden hatte, ergab sich ein pH von $7,25 \pm 0,2$ (Ansäuerung nur durch das Begasen), während das pH dort, wo keine oder kaum eine Hemmung stattgefunden hatte, um die oben angegebenen Beträge abgefallen war (Ansäuerung durch saure Stoffwechselprodukte).

Dabei gilt, daß sich die entstandene CO_2 -Menge ($\triangleq$ Säurebildung) und die meßbare Ansäuerung annähernd proportional verhalten (s. Abb. 6 und Tab. 2).

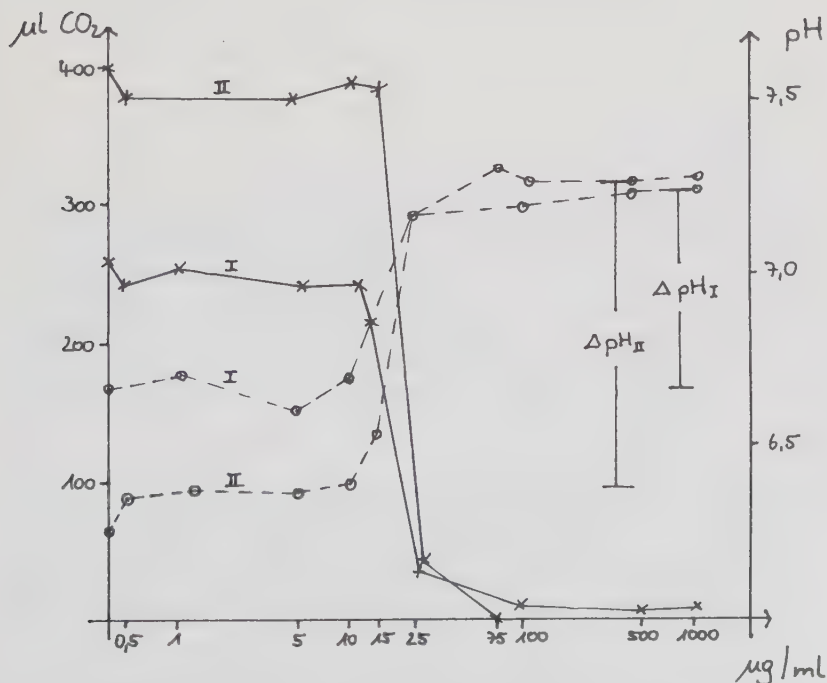


Abb. 6 Umsatz in Abhängigkeit von der Konzentration an Chlorhexidin und zugehöriges pH der verschiedenen Ansätze nach Abschluß des Versuches (Beispiele: Stamm 441, I. und II. Durchgang)

Stamm	Hemmung		keine Hemmung		Umsatz (μ l)
	durchschnitt. pH	pH- Ver- schiebg.	durchschnitt. pH	pH- Ver- schiebg.	
626 II.	7,25	0,5	7,0	0,75	102
T3/67 II.	7,35	0,4	6,45	1,3	384
T5/13 II.	7,25	0,5	6,7	1,05	295
T3/52 II.	7,15	0,6	6,65	1,1	261
441 I.	7,25	0,5	6,65	1,1	258
441 II.	7,3	0,45	6,35	1,4	398
634 I.	7,05	0,7	6,8	0,95	135
T3/53 I.	7,25	0,5	7,0	0,75	181
	7,23	0,5	6,7	1,05	252

Tab. 2 Durchschnittliches pH einiger Stichproben am Ende und Verschiebung während des Versuchs nur durch Begasen (bei nahezu vollständiger Hemmung) sowie durch Begasen und saure Stoffwechselprodukte (keine Hemmung);
Anfangs-pH: 7,75

2. STOFFWECHSELHEMMUNG DURCH CHLORHEXIDIN (*Strep. mutans*)

Die Versuche ergaben in allen Fällen eindeutig eine von der Konzentration an Chlorhexidin abhängige, oberhalb einer Schwellenkonzentration einsetzende Hemmung der Säurebildung von *Streptokokkus mutans*. Im folgenden wird zur quantitativen Beschreibung dieser Hemmwirkung neben den Absolutwerten entstandener Gasmengen vor allem die jeweils eingetretene prozentuale Hemmung betrachtet, bezogen auf den nicht durch Chlorhexidin beeinflussten Stoffwechsel. Damit ist dann auch ein Vergleich der verschiedenen untersuchten Stämme möglich.

2.1. Absolute Werte

Auf Grund der beschriebenen allgemein starken Umsatzenschwankungen wiesen auch die in Anwesenheit der verschiedenen Konzentrationen des Hemmstoffs entstandenen Gasmengen große Schwankungen auf. Dennoch zeigte die Form der Kurven (halblogarithmische Darstellung), die die Abhängigkeit der CO₂-Bildung von der Konzentration an Hemmstoff wiedergeben, für sämtliche Stämme große Ähnlichkeit (s. Abb. 7). Der Verlauf ließ sich in drei Abschnitte unterteilen:

- A — Im Bereich niedriger Konzentrationen (bis ca. 10—15 μ g/ml) trat keine oder nur geringe Hemmung ein.
- B — Nach Überschreiten einer Schwellenkonzentration, die im Bereich zwischen 10 und 15 μ g/ml lag, genügte eine nur geringe Steige-

rung der Konzentration, um eine mehr oder weniger vollständige Stoffwechselhemmung zu erzielen. Diese war im Bereich zwischen 25 und 75 $\mu\text{g/ml}$ erreicht.

C — Eine noch weiterreichende Hemmung ließ sich auch durch höhere Konzentrationen nicht erzielen.

War es zu keiner vollständigen Hemmung gekommen, d. h. konnte auch bei hohen Konzentrationen noch eine Gasbildung nachgewiesen werden, so hatte diese fast ausschließlich innerhalb der ersten 15 min stattgefunden.

Am Rande ist zu bemerken, daß im Bereich unterhalb der Schwellenkonzentration (d. h. bei Konzentrationen von 0,5, 1 und/oder 5 $\mu\text{g/ml}$) in einigen Durchgängen mehr CO_2 entstanden ist als in den Referenzmeßgläsern ohne Chlorhexidin (s. Abb. 8, 13, 14, 17, 20, 21). Eine Berücksichtigung erscheint jedoch fragwürdig, da sich die gemessenen Werte im Bereich der Fehlerbreite von $\pm 10\%$ bewegen (vgl. S. 52).

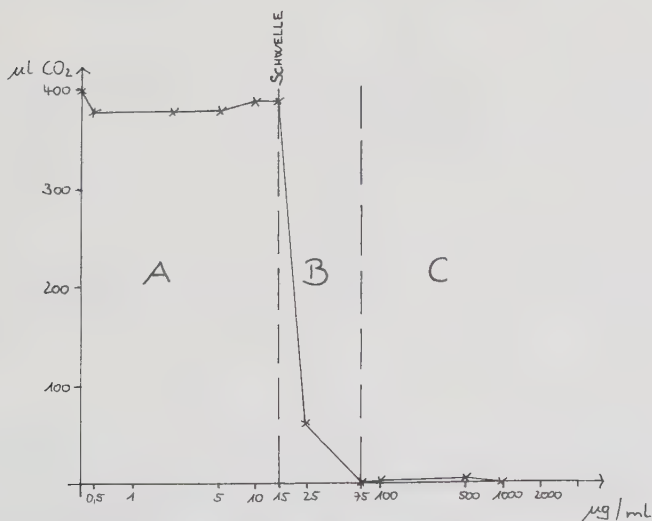


Abb. 7 Umsatz (in $\mu\text{l CO}_2$) in Abhängigkeit von der Konzentration an Hemmstoff; Beispiel: Stamm 441, II. Durchgang

2.2. Prozentuale Hemmung

2.2.1. Zur Auswertung

Vergleichbare Werte, die den Umsatz unberücksichtigt lassen, wurden wie folgt errechnet: die zu den verschiedenen Zeiten in den verschiedenen Ansätzen bestimmten Gasvolumina wurden in Prozent der zugehörigen, ohne Zusatz von Hemmstoff entstandenen Gasmenge, berechnet.

Die „prozentuale Hemmung“ ergab sich dann als 100 % abzüglich dieses Wertes. Es gilt also:

0 % — Hemmung: der Umsatz ist gleich dem Umsatz ohne Zusatz von Chlorhexidin, d. h. keine Hemmung;

100 % — Hemmung: kein Umsatz, d. h. totale Hemmung.

Alle Werte dazwischen bezeichnen eine mehr oder weniger starke Hemmung, negative Werte entsprechen einem beschleunigten Stoffwechsel.

Um für jede Hemmstoffkonzentration einen vergleichbaren Wert zu erhalten, wurden jeweils drei bis vier Zeiten aus dem linearen Teil der Umsatzkurve ausgewählt und der Mittelwert der jeweiligen prozentualen Hemmungen zu diesen Zeitpunkten für eine bestimmte Konzentration errechnet.

Dieser Wert ergab dann die „mittlere prozentuale Hemmung“.

2.2.2. Mittlere prozentuale Hemmung

Die derart ermittelten Werte lagen für alle Durchgänge relativ dicht beisammen, d. h. alle elf untersuchten Strep. mutans-Stämme scheinen ähnlich empfindlich gegenüber dem Hemmstoff zu sein.

Die graphischen Darstellungen der Abhängigkeiten der mittleren prozentualen Hemmung von der Konzentration an Hemmstoff (Abb. 8 und 11—21) ließen sich wieder wie folgt gliedern:

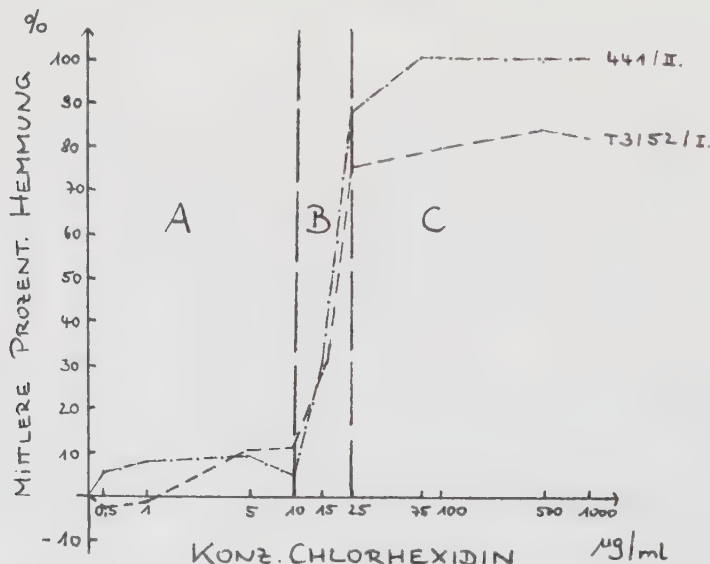


Abb. 8 Mittlere prozentuale Hemmung in Abhängigkeit von der Konzentration an Hemmstoff = „Hemmkurve“

Beispiele: Stamm 441, II. Durchgang

Stamm T3/52 I. Durchgang

- Bereich A — keine oder nur geringe Hemmung bis ca. 10 $\mu\text{g/ml}$
- Bereich B — nach Überschreiten der Schwellenkonzentration sprunghaftes Ansteigen der Hemmwirkung bei geringer Zunahme der Konzentration bis ca. 25—75 $\mu\text{g/ml}$
- Bereich C — keine Steigerung der Hemmung durch weitere Erhöhung der Konzentration

Über diese drei Bereiche kann man jetzt folgende vergleichenden quantitativen Aussagen machen:

Bereich A

Hier wie im Bereich C ergaben sich größere Abweichungen der verschiedenen gewonnenen Kurven voneinander. Das Ende des Bereichs A war jedoch immer mehr oder weniger deutlich an der Schwellenkonzentration ablesbar. Die bei 10 $\mu\text{g/ml}$ erreichte Hemmung schwankte, abgesehen von vier stark abweichenden Durchgängen, zwischen 0 und 19 % und lag im Durchschnitt aller Durchgänge bei nur 13 %.

Bereich B

Als auswertbar und zur Charakterisierung geeignet erwies sich dieser mittlere Bereich, da hier die Werte der verschiedenen Durchgänge einerseits am besten übereinstimmen und andererseits wohl für eine praktische Anwendung am interessantesten sind. Deshalb wurden für jeden Durchgang aus den gewonnenen Kurven die für 25, 50 und 75 %ige Stoffwechselhemmung benötigten Konzentrationen an Chlorhexidin graphisch ermittelt und in Form eines Histogramms dargestellt (s. Abb. 9). Drei Werte erschienen notwendig, um festzustellen, ob einzelne abweichende Ergebnisse ganze Durchgänge oder nur Teilbereiche betrafen.

Bereich C

Die im Durchschnitt erreichte Hemmung betrug bei einer Konzentration von 75 $\mu\text{g/ml}$ 96 %, bei einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ 94 %, in beiden Fällen zwischen 75 und 100 % schwankend.

Werte unter 100 % ergaben sich dadurch, daß bei den genannten Konzentrationen teilweise innerhalb der ersten 15 bis max. 30 min noch eine Gasbildung abzulesen war, die dann im Laufe der beschriebenen Berechnung zu den niedrigen Endwerten, die ja Mittelwerte über die Zeit darstellen, führte.

Insgesamt erwies sich die Hemmung als unabhängig von der Umsatzgeschwindigkeit. Zwar fallen, wie später beschrieben, in einigen Fällen größere Abweichungen der ermittelten Hemmkonzentrationen mit extrem hohen oder niedrigen Umsatzgeschwindigkeiten zusammen, es besteht jedoch keine Korrelation zwischen Richtung der Abweichung und Größe der Umsatzgeschwindigkeit.

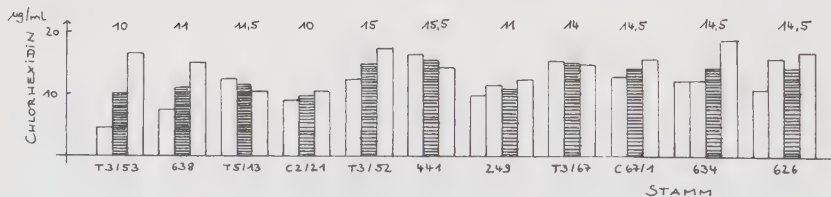
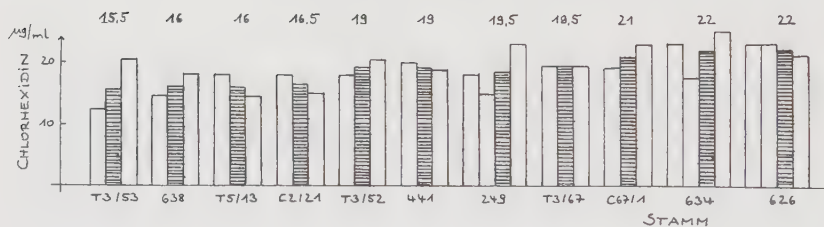
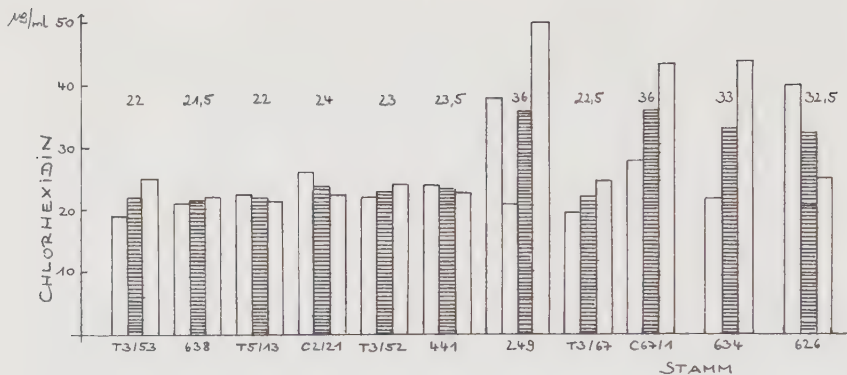


Abb. 9

Für eine mittlere prozentuale Hemmung von 25, 50 und 75 % notwendige Konzentrationen an Chlorhexidin (Strep. mutans)
 weiße Balken: einzelne Durchgänge
 gestreifte Balken: Mittelwert (darüber in Zahlen)

Die gemeinsame Betrachtung sämtlicher Durchgänge führt zu folgenden Ergebnissen:

Für	25 %ige Stoffwechselhemmung notwendige Konzentrationen:		
	Mittelwert aus allen Durchgängen	13	µg/ml
	Minimum (Stamm T 3/53 I. D.)	4	µg/ml
	Maximum (Stamm 634 III. D.)	19	µg/ml
	Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert = Fehler	2,7	µg/ml
	Abweichungen der einzelnen Durchgänge eines Stammes untereinander	Min.	0,5 µg/ml
		Max.	12,5 µg/ml
		durchschnittl.	3,8 µg/ml
Für	50 %ige Stoffwechselhemmung notwendige Konzentrationen:		
	Mittelwert aus allen Durchgängen	19	µg/ml
	Minimum (Stamm T 3/53 I. D.)	12,5	µg/ml
	Maximum (Stamm 634 III. D.)	25	µg/ml
	Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert = Fehler	2,5	µg/ml
	Abweichungen der einzelnen Durchgänge eines Stammes untereinander	Min.	0 µg/ml
		Max.	8 µg/ml
		durchschnittl.	3,6 µg/ml
Für	75 %ige Stoffwechselhemmung notwendige Konzentrationen:		
	Mittelwert aus allen Durchgängen	27	µg/ml
	Minimum (Stamm T 3/53 I. D.)	19	µg/ml
	Maximum (Stamm 249 III. D.)	50	µg/ml
	Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert = Fehler	6,7	µg/ml
	Abweichungen der einzelnen Durchgänge eines Stammes untereinander	Min.	1 µg/ml
		Max.	29 µg/ml
		durchschnittl.	10 µg/ml

2.2.3. Prozentuale Hemmung zu verschiedenen Zeitpunkten

Betrachtet man nicht die mittlere prozentuale Hemmung, sondern vergleicht die Werte für die prozentuale Hemmung des Stoffwechsels nach 30 min mit denen am Ende der linearen Umsatzphase, so zeigt sich in 14 der 25 Durchgänge kaum eine Differenz ($\pm 5\%$), in den restlichen Durchgängen aber eine Abweichung von in Einzelfällen bis zu max. $\pm 30\%$. Die Richtung der Abweichung scheint von der Konzentration an Hemmstoff abzuhängen (s. Tab. 3).

Im Bereich der deutlich hemmenden Konzentrationen (untersucht am Beispiel 100 $\mu\text{g/ml}$) war die Hemmung in den Fällen, in denen Differenzen auftraten, zu Versuchsbeginn (30 min) immer unvollständiger als zu Versuchsende (90—180 min), wo stets eine mindestens 90 %ige Hemmung erreicht wurde.

Im Bereich unterhalb der Schwellenkonzentration, d. h. kaum hemmender Konzentrationen (Beispiel 5 $\mu\text{g/ml}$), erwies sich die Hemmung in 9 der 11 Durchgänge mit deutlichen Differenzen zu Versuchsbeginn stärker als zu Versuchsende.

Stamm	Konz. Chlorh. $\mu\text{g/ml}$	Prozent. Hemmung nach		
		30 min	180 min	
634 II.	5 100	−14 % 100 %	−10 % 100 %	keine großen Differenzen
T5/13 I.	5 100	17 % 83 %	7 % 97 %	deutliche Abweichungen

Tab. 3 Prozentuale Stoffwechselhemmung zu verschiedenen Zeiten; zwei Beispiele

3. BEEINFLUSSUNG WEITERER BAKTERIENARTEN

Da nur vereinzelte Untersuchungen und Ergebnisse über die Wirkung von Chlorhexidindigluconat auf *Streptokokkus mutans* vorliegen, wohl aber Untersuchungen andere Mikroorganismen betreffend, wurde zum Vergleich je ein Stamm dreier weiterer Gattungen sowie eine weitere *Streptokokkenart* im Warburg-Versuch beobachtet.

Die Versuche mit *Strep. salivarius* und *E. coli* fanden wie die mit *Strep. mutans* unter anaeroben Bedingungen, die mit *Staph. aureus* und *Candida albicans* unter aeroben Bedingungen statt.

Als Bezugsgröße zur Bestimmung der prozentualen Hemmung diente wieder der Mittelwert des Umsatzes aus zwei Ansätzen ohne Zusatz von Chlorhexidin (s. Tab. 4).

Alle vier Arten zeigten die gleichen Charakteristika in bezug auf die Abhängigkeit der Hemmung von der Konzentration an Hemmstoff wie die beschriebenen *Strep. mutans*-Stämme: kaum Hemmung bis zu einer Schwellenkonzentration, dann schnelles Ansteigen bis zu vollständiger oder nahezu vollständiger Hemmung, mit weiterer Erhöhung der Konzentration an Chlorhexidin jedoch keine weitere Verbesserung der Hemmung (Abb. 22—25).

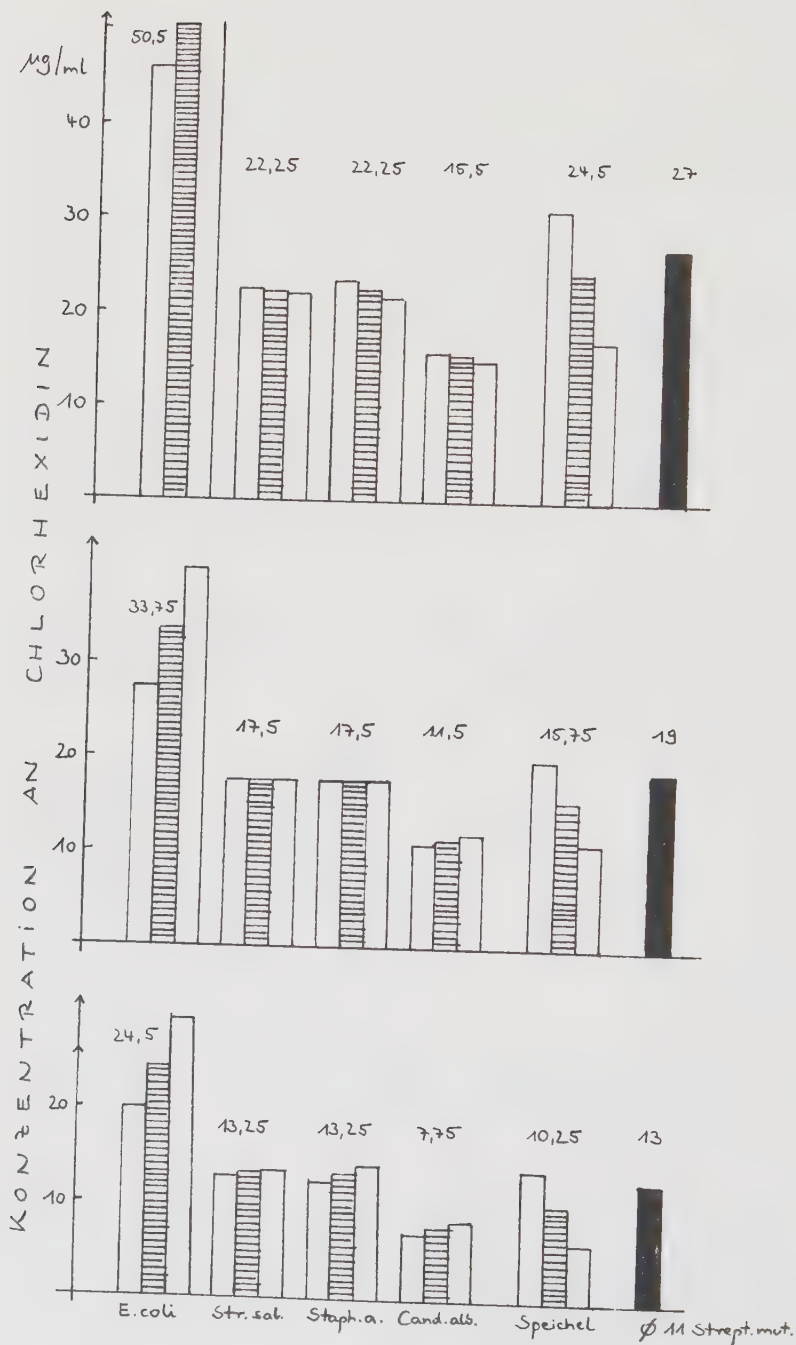
Quantitativ lagen die Schwellenkonzentration und somit auch die für 25, 50 und 75 %ige Hemmung ermittelten Werte für *Strep. salivarius* und *Staph. aureus* ebenfalls im Bereich derer für *Strep. mutans*, während die für *E. coli* etwas darüber und die für *Cand. albicans* etwas darunter aufgefunden wurden (s. Abb. 10 und Tab. 9).

Art	gebildete Menge CO ₂ in μ l		verbrauchte Menge O ₂ in μ l		Umsatz- geschwindig- keit	
	I	II	I	II	I	II
<i>Strep. sal.</i>	413	412			9,1	7,3
<i>E. coli</i>	778	780			14,5	12,7
<i>Staph. aureus</i>			258	327	1,4	1,9
<i>Cand. albicans</i>			789	748	5,0	4,7

Tab. 4 Umsatz am Ende der linearen Phase bzw. nach 180 min und Umsatzgeschwindigkeit ohne Hemmstoff

Abb. 10 (siehe nächste Seite)

Für eine mittlere prozentuale Hemmung von 25, 50 und 75 % notwendige Konzentrationen an Chlorhexidin
weiße Balken: einzelne Durchgänge
gestreifte Balken: Mittelwert (darüber in Zahlen)



4. BEEINFLUSSUNG VON SPEICHEL

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem ein Vergleich der ermittelten Hemmkonzentrationen mit den Verhältnissen in der Mundhöhle. Nach Ansicht verschiedener Autoren verhalten sich jedoch erstens Mikroorganismen aus der Mundhöhle gegenüber dem Hemmstoff anders als solche aus Reinkulturen, und zweitens soll die Anwesenheit biologischer Flüssigkeiten einen Schutz für die Bakterienzelle bieten.

Um das Ausmaß solcher Auswirkungen unter den vorliegenden Bedingungen abzuschätzen und somit eine Übertragung der übrigen gewonnenen Werte in die Praxis zu ermöglichen, wurde die verwendete Bakteriensuspension unter sonst gleichen Voraussetzungen in zwei (anderen) Versuchen durch menschlichen Nüchternspeichel ersetzt.

Der sich daraus ergebende Hemmkurvenverlauf wies wieder die beschriebenen drei Bereiche auf. Es ergaben sich die in Tab. 5 und Abb. 10 aufgezeigten Werte.

	I. D.	II. D.	Mittelw.	Mittelw. Strep. mutans
gebildete Menge CO ₂ am Ende der li- nearen Phase (μl)	444	456	450	309
Umsatzgeschwindig- keit (μl/min)	5,3	3,9	4,6	2,5
für x % Hemmung notwendige Konz. (μg/ml)				
25 %	14	6,5	10,25	13
50 %	20	11,5	15,75	19
75 %	32	17	24,5	27

Tab. 5 Umsatz und Umsatzgeschwindigkeit ohne Hemmstoff und Hemmung des Speichelstoffwechsels durch Chlorhexidin

V. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse reihen sich weitgehend übereinstimmend in die bereits bekannten, mit Hilfe anderer Methoden gewonnenen Daten über die Wirkung von Chlorhexidin ein. Im einzelnen führen sie zu folgenden Überlegungen und Schlußfolgerungen bzw. Vermutungen.

1. NEBENBEFUNDE

1.1. Umsatz ohne Chlorhexidin

Die Geschwindigkeit der Säurebildung von Plaque-Streptokokken ist nach Aussage von u. a. C. P. Moll (39) von Stamm zu Stamm sehr unterschiedlich, während F. Schmid in seiner 1974 veröffentlichten Untersuchung über das Wachstumsverhalten kariogener Streptokokken auf Glucosenährböden (54) u. a. zu dem Ergebnis kommt, daß nicht nur die CO₂-Produktion eines Stammes in mehreren Versuchen relativ konstant bleibt, sondern daß auch verwandte Stämme bei gleicher Dichte der Suspension ähnliche Umsatzgeschwindigkeiten aufweisen.

Als eine Ursache der unter den vorliegenden Bedingungen beobachteten starken Umsatzschwankungen auch innerhalb eines Stammes an verschiedenen Tagen könnten Schwankungen des Prozentsatzes toter Organismen in der Suspension in Frage kommen. Schmid hat beobachtet, daß bei einer Bebrütungszeit von 18 h rund die Hälfte der Organismen in der Suspension bereits tot ist, nach 24 h schon rund drei Viertel. Da im vorliegenden Fall die Bebrütungszeit aus versuchstechnischen Gründen teilweise um ± 2 h variierte, erklärt sich schon daraus eine Veränderung der Umsatzgeschwindigkeit. Außerdem läßt sich vermuten, daß das Ende der logarithmischen Phase und somit die Anzahl der nach 18 h bereits toten Organismen noch von zwei weiteren Faktoren beeinflußt wurde. Zum einen variierte die Menge der in das Flüssignährmedium überimpften Mikroorganismen abhängig von der Anzahl und Größe der auf der Blutplatte verfügbaren Kolonien. Zum anderen hatte möglicherweise das Alter der Kulturen auf den Blutplatten einen Einfluß auf das Wachstum der Flüssigkulturen.

Da sich jedoch, von einigen Extremfällen abgesehen (siehe V. 2.1.), kein Zusammenhang zwischen Umsatzgeschwindigkeit und notwendigen Hemmstoffkonzentrationen zeigt, ist anzunehmen, daß die Hemmung der lebenden durch die Anwesenheit toter Organismen nicht merklich beeinflußt wird.

1.2. Wasserstoffionenkonzentration

Die Adsorption von Chlorhexidin an Bakterienzellen erreicht nach verschiedenen Untersuchungen (25, 28) im Bereich um pH 7 und darüber ihr Maximum. Schwankungen um $\pm 0,5$ pH-Stufen innerhalb dieses Bereiches bewirken noch kaum eine Änderung der Aufnahme. Das bedeutet,

daß sich die in der vorliegenden Untersuchung aufgetretenen pH-Schwankungen im Bereich der optimalen Wirksamkeit des Hemmstoffs bewegen.

Eine deutliche Verschlechterung der Wirkung bleibt jedoch bei den in den Plaques vorkommenden niedrigen pH-Werten zu erwarten.

2. STOFFWECHSELHEMMUNG DURCH CHLORHEXIDIN

2.1. Vergleich der 11 Streptokokkus mutans-Stämme

Die mit Hilfe dieser Untersuchung ermittelten Daten lassen vermuten, daß sämtliche elf untersuchten Streptokokkus mutans-Stämme gleichermaßen empfindlich gegenüber Chlorhexidin sind, da die durchschnittliche Abweichung sämtlicher Durchgänge voneinander (sowohl für 25, 50 als auch 75 %ige Stoffwechselhemmung) geringer ist als die durchschnittlichen Abweichungen der verschiedenen Durchgänge jedes einzelnen Stammes voneinander.

Betrachtet man die Konzentrationen, die eine 50 %ige Hemmung hervorrufen, — hier war die Übereinstimmung am besten — so ergibt sich eine durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert von $\pm 2,5 \mu\text{g/ml}$, das entspricht bei einem Mittelwert von $19 \mu\text{g/ml}$ einer Fehlerbreite von $\pm 13 \%$, ein Wert, der im Rahmen der Fehlerbreite der Untersuchungsmethode liegt.

Für 25 %ige und 75 %ige Hemmung beträgt der Fehler ± 21 bzw. 25% , hervorgerufen durch einige wenige stärker abweichende Durchgänge (T3/53 I. D., 634 III., 626 II., 249 I. und III., C67/1 II.). Die Verschiebungen betreffen jedoch immer Einzeldurchgänge verschiedener Stämme, meist sogar nur Bereiche dieser einzelnen Durchgänge (25 %ige oder 75 %ige Hemmung), nie alle Durchgänge eines Stammes übereinstimmend.

Als mögliche Erklärung für das Zustandekommen dieser Abweichungen kommen in Frage:

- in vier der sechs Fälle waren diese Durchgänge mit einer besonders hohen bzw. besonders niedrigen Umsatzgeschwindigkeit verbunden. Der daraus folgende sehr kurze Beobachtungszeitraum bzw. geringe Substratumsatz führen zur Vergrößerung eventuell vorhandener Fehler; wie erwähnt besteht jedoch keine Korrelation zwischen Richtung der Abweichung und Größe der Umsatzgeschwindigkeit;
- in zwei Fällen lag der Wert für die 75 %ige Hemmung nicht mehr im linearen Bereich der Hemmkurve (s. IV. 3.2.2.);

Insgesamt ist deshalb anzunehmen, daß größere Abweichungen nicht durch eine abweichende Empfindlichkeit einzelner Stämme zustande gekommen sind.

Eine Bestätigung für dieses Ergebnis läßt sich eventuell in den Untersuchungen von Kalowski und Kedzia (32) sehen. Sie bestimmten die für Bakterio­stase notwendigen Konzentrationen an Chlorhexidin für verschiedene Stämme unter anderem der Arten *Strep. sanguis*, *mutans* und

salivarius und fanden deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Arten, aber nur geringe innerhalb einer Art.

2.2. Andere Mikroorganismen und Speichel

Die Untersuchung der Wirkung des Chlorhexidins auf den Stoffwechsel der vier weiteren Bakterienarten ergibt, daß der beobachtete Ablauf keine unter den vorliegenden Bedingungen für Streptokokken charakteristische Form darstellt. Zusammen mit den, wie sich zeigte, recht geringen quantitativen Abweichungen erlaubt das einen direkten Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeiten, die solche Mikroorganismen untersuchten (s. V. 3.). Außerdem ist zu beachten, daß relativ größere Abweichungen auch hier nur zwischen den verschiedenen Arten, nicht innerhalb einer Art bestanden.

Für das mit den übrigen Ergebnissen auch quantitativ bemerkenswert gut übereinstimmende Resultat der Speicheluntersuchungen kommt das Zusammenwirken von zwei Faktoren in Betracht: die Anwesenheit von Chlorhexidin adsorbierenden Speichelproteinen hätte eine Erhöhung der zur Stoffwechselhemmung notwendigen Konzentration an Chlorhexidin bedingen müssen; da jedoch den meisten der suspendierten Speichelmikroorganismen im Gegensatz zu denen der Reinkultur die schützende EPS-Schicht fehlt (47), ergaben sich im Endeffekt ähnliche Hemmkonzentrationen wie in den übrigen Versuchen.

Die Übereinstimmung erlaubt einen direkten Vergleich der für Reinkulturen ermittelten Hemmkonzentrationen mit in der Mundhöhle nach Chlorhexidinspülungen anzutreffenden Konzentrationen. Im folgenden (siehe V. 4.) wird der Versuch unternommen, daraus eine quantitative Aussage über die den Bakterienstoffwechsel hemmende und somit kariesprophylaktische Wirkung des Chlorhexidins abzuleiten.

3. ÜBERLEGUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS

Der beobachtete charakteristische dreiphasige Verlauf der konzentrationsabhängigen Wirkung des Hemmstoffs führt zu der Überlegung, welche Veränderungen an den Zellen bei Einwirkung der verschiedenen Konzentrationen (d. h. in den drei Bereichen) stattfinden. Anhand der vorliegenden Untersuchung allein läßt sich diese Frage jedoch nicht beantworten. Es bleibt offen, ob mit steigender Konzentration eine sich steigernde Hemmung des Stoffwechsels jeder einzelnen Zelle erzielt wird oder ob immer mehr Zellen gehemmt bzw. abgetötet werden und daraus die insgesamt beobachtete „Stoffwechselhemmung“ resultiert.

Teilweise könnte darüber ein Vergleich mit den im Rahmen anderer Untersuchungen bestimmten bakteriostatisch bzw. vor allem bakterizid wirksamen Konzentrationen Aufschluß geben. Solche direkten Vergleiche sind jedoch aus verschiedenen Gründen nur bedingt möglich. Die wirksamen Hemmstoffkonzentrationen hängen von einigen Faktoren

ab, die teilweise nicht genannt oder mit den Daten der vorliegenden Arbeit nicht vergleichbar sind. Solche Faktoren sind:

— Bakterienart

Hier wäre ein Vergleich bei sonst gleichen Bedingungen möglich, da das Verhalten der am häufigsten untersuchten Mikroorganismen (Staph. aureus, E. coli) unter den vorliegenden Bedingungen und im Verhältnis zu den Streptokokken der mutans-Reihe bekannt ist.

— pH

Auch die deutliche pH-Abhängigkeit erscheint nicht gravierend, da sich alle zum Vergleich herangezogenen Untersuchungen im Bereich des Mundhöhlen-pH bewegen.

— Dichte der Bakteriensuspension

A. Davies et. al. (8) stellen hierzu fest, daß die Wirksamkeit abhängig ist von dem Verhältnis der Chlorhexidinmenge zur vorhandenen Zellmasse. Eine Verdünnung der Bakteriensuspension auf $\frac{1}{10}$ ergab nach seinen Untersuchungen eine Verringerung der für die gleiche Wirkung erforderlichen Konzentrationen auf ungefähr ein Drittel (s. auch III. 5.). Diese schränkt die Vergleichbarkeit mit anderen Untersuchungen schon stark ein, da die Dichte der Suspension teilweise gar nicht, teilweise in Form nicht vergleichbarer Zahlenwerte (z. B. durch Auszählung gewonnen) angegeben ist.

— Anwesenheit biologischer Flüssigkeiten

In Anwesenheit von Serum sinkt die Wirksamkeit von Chlorhexidin nach Untersuchungen von T. D. Hennessey (24) auf mindestens ein Viertel, nach S. G. Hesselgren (26) erhöht die Anwesenheit von Speichel die Schwellenkonzentration für eine bakterizide Wirkung sogar um das Zehnfache, wahrscheinlich auf Grund einer Adsorption von Chlorhexidin an dessen Bestandteile, wodurch die verfügbare Menge verringert wird.

— Zuckerhaltiges oder -freies Nährmedium

Weiter erscheint die Tatsache wichtig, ob die Bakterien in An- oder Abwesenheit von Zucker angezüchtet wurden. Hennessey (24) und A. Davies (9) führen die verminderte Wirksamkeit auf eine Schutzschicht von extrazellulären Polysacchariden zurück, die in zuckerfreiem Medium nicht gebildet werden kann.

Auch Plaque-Mikroorganismen erweisen sich als weniger empfindlich als solche aus zuckerfreien Reinkulturen (26).

Unter Berücksichtigung der so bedingten Variationsbreite sei dennoch auf einige Zahlenwerte bereits erwähnter, in etwa vergleichbarer Untersuchungen hingewiesen:

bakteriostatisch wirksame Konzentrationen werden für Strep. mutans bzw. Plaques-Streptokokken allgemein zwischen 0,1 und 4 $\mu\text{g/ml}$ angegeben, d. h. in einem Bereich der nach der vorliegenden Untersuchung deutlich unter der Schwellenkonzentration, die zu einer Hemmung der Säurebildung führt, liegt.

Bakterizide Wirkung tritt nach verschiedenen Untersuchungen zwischen 1 und 200 $\mu\text{g/ml}$ konzentrationsabhängig ein.

Untersuchungen, die Stoffwechselvorgänge betreffen, scheinen sehr viel seltener gemacht worden zu sein. Eine solche Untersuchung ist die von F. M. Harold und Mitarbeitern an *Strep. faecalis* (23). Er beschreibt die Wirkung von Chlorhexidin auf die ATPase-Aktivität sowie auf den Kationenaustausch und die mit der K^+ -Aufnahme verbundene Stimulation der Glykolyse. Die wirksamen Konzentrationen liegen hier zwischen 1 und 20 $\mu\text{g/ml}$, das entspräche dem unter-schwelligen bzw. dem Bereich um die Schwellenkonzentration. H. Luoma (38) untersuchte die Folgen der Gabe von Kombinationen von Fluor und Chlorhexidin auf die Säureproduktion von kariogenen Streptokokken. Er beobachtete deutliche bis nahezu vollständige Hemmung der Säurebildung bei Konzentrationen um ca. 50 $\mu\text{g/ml}$, ein Wert, der mit den vorliegenden Daten gut übereinstimmt. Diese Zahlen können jedoch, wie ausgeführt, kaum Aufschluß über die Frage nach dem Mechanismus geben.

Ein mehr qualitativer Vergleich der gewonnenen Ergebnisse erscheint dagegen sinnvoll, da sich hier deutliche Übereinstimmungen mit anderen Untersuchungen abzeichnen.

Als geeignet für einen solchen qualitativen Vergleich erwiesen sich die Arbeiten von Hugo und Longworth (28 — 31, 37), die später weitgehend auch an Hand anderer Mikroorganismen durch Davies, Bentley und Fields (8) bestätigt wurden. Sie beschreiben die konzentrationsabhängige Wirkung von Chlorhexidin auf *E. coli* in Form dreier verschiedenartiger Reaktionen der Zelle:

- Unterhalb einer bereits bakteriostatisch wirksamen Konzentration zeigen sich keine oder kaum Veränderungen an der Bakterienzelle. Es ist lediglich eine Anregung der Dehydrogenase-Aktivität zu beobachten.
- Darüber kommt es zu einer Störung der Permeabilität der Membranen mit Austritt von Cytoplasmabestandteilen, die Dehydrogenase-Aktivität nimmt schnell ab bis auf Null. Im Elektronenmikroskop erscheinen die Zellen leer, die Membranen zerrissen. Es kommt noch nicht zu einer bakteriziden Wirkung.
- In Anwesenheit noch höherer Konzentrationen tritt kein intrazelluläres Material aus, das Cytoplasma erscheint koaguliert, die Membranen granuliert. Die Substanz wirkt bakterizid.

Die Adsorption von Chlorhexidin durch die Zelle nimmt in allen drei Bereichen kontinuierlich zu.

Da die vorliegende Arbeit ergab, daß sich die Wirkung des Hemmstoffs auf *E. coli* unter den gegebenen Bedingungen nur geringfügig quantitativ, nicht aber qualitativ von der auf *Strep. mutans* unterscheidet, scheint eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf unsere Ergebnisse gerechtfertigt. Für die Übertragbarkeit spricht auch, daß die für die einzelnen Reaktionen ermittelten Konzentrationsbereiche beider Untersuchungen größenordnungsmäßig gut übereinstimmen.

Es ist anzunehmen, daß die drei beschriebenen verschiedenartigen Reaktionen der Zellen den drei Bereichen der hier ermittelten Hemmkurven vergleichbar sind.

Folgender Mechanismus erscheint daher möglich:

- Die Säurebildung von *Strep. mutans* wird durch Chlorhexidin bis zu einer Schwellenkonzentration kaum beeinflusst.
- Oberhalb dieser Schwellenkonzentration führt die Desorganisation der Zellmembran und der Austritt von Cytoplasmateilchen zu einer Reduktion des Stoffwechsels.
- Vollständige Hemmung tritt mit Eintritt von Chlorhexidin in die Zelle und Präzipitation des Cytoplasmas ein. Es kommt zum Absterben der Mikroorganismen.

Insgesamt folgt daraus, daß die beobachtete verminderte Gesamt-CO₂-Bildung im mittleren Bereich wahrscheinlich auf eine Stoffwechselhemmung jeder einzelnen Zelle und nicht auf ein Absinken der Gesamtzahl noch lebender Organismen zurückzuführen ist. Erst das Ende der linearen Phase der Hemmkurve zeigt dann den Beginn bakterizider Wirksamkeit an.

Für die beobachtete zeitliche Abhängigkeit der Hemmung in einigen Durchgängen läßt sich eine Erklärung nur vermuten. Die Tatsache, daß in Anwesenheit hoher Konzentrationen innerhalb der ersten 15 — 30 min teilweise dennoch eine Säurebildung stattfand, könnte auf das Vorhandensein einer anzuchtbedingten besonders ausgeprägten EPS-Schicht zurückzuführen sein, die die Diffusion und Adsorption des Chlorhexidins verlangsamt.

Auch C. E. Davies (10) beobachtet bei der von ihm gewählten kurzen Einwirkungszeit, daß sehr viel höhere Konzentrationen notwendig sind, um 100 %ige gegenüber 99 %iger bakterizider Wirkung zu erzielen. Die von ihm untersuchten Mikroorganismen bildeten jedoch keine EPS, und er kann auch keine Erklärung für seine Beobachtung abgeben.

Die teilweise geringere Hemmung zu Versuchsende als zu Beginn in Anwesenheit niedriger Konzentrationen mag auf eine aus der Enzymchemie auch anderweitig bekannte mit der Zeit induzierte Mehrleistung der noch nicht beeinflussten Enzymsysteme zurückzuführen sein.

Die in einigen Durchgängen beobachtete Anregung des Stoffwechsels im Bereich unterhalb der Schwellenkonzentration kann nicht als gesichert angesehen werden, da die Werte nicht deutlich genug oberhalb der Fehlergrenze liegen. Die Tatsache, daß allgemein einer Hemmung von Enzymsystemen häufig eine Anregung vorausgeht, legt lediglich die Vermutung nahe, es könnte sich auch hier um Reparaturprozesse handeln.

4. VERSUCH DER ÜBERTRAGUNG IN DIE PRAXIS

Eine dänisch-norwegische Forschergruppe (3, 4) hat 1974 untersucht, wieviel Chlorhexidin nach der üblicherweise gewählten einminütigen Spülung mit 10 ml einer 0,2 %igen Lösung in der Mundhöhle zurückbleibt und welche Konzentrationen im Speichel in Abhängigkeit von der Zeit daraus resultieren. Es ergaben sich (individuell verschieden) Konzentrationen von 80 — 300 $\mu\text{g/ml}$ direkt nach der Spülung. Trotz Adsorption an Gewebe der Mundhöhle und Rückgabe von dort sanken diese Konzentrationen nach 4 Stunden auf weniger als die Hälfte und betrugen nach 12 Stunden nur noch 1 — 10 $\mu\text{g/ml}$.

Ein Vergleich dieser mit den hier ermittelten Werten erscheint statthaft, da die notwendigen Hemmstoffkonzentrationen unter den vorliegenden Bedingungen für die im Speichel suspendierten Mikroorganismen kaum von denen der Reinkulturen abwichen (vgl. IV. 2.3.). Es ergäbe sich daraus folgendes:

Eine nahezu vollständige Hemmung der Säurebildung ist nur innerhalb der ersten Stunde nach der Mundspülung zu erwarten, eine bis zu 50 %ige Reduktion jedoch noch nach 6 Stunden. Die später vorhandenen Konzentrationen dürften den Bakterienstoffwechsel kaum noch beeinflussen, jedoch mit Sicherheit noch bakteriostatisch wirksam sein.

Schwieriger werden die Verhältnisse bei Betrachtung der Plaques-Mikroorganismen. Hier müssen zusätzlich folgende Faktoren berücksichtigt werden:

- das Vorhandensein dicker Schichten von EPS als Schutzschichten;
- die Frage, in welchem Maße Chlorhexidin in die Plaques hineindiffundiert;
- das saure Milieu innerhalb der Plaques.

Es läßt sich vermuten, daß hier insgesamt ungünstigere Verhältnisse für eine Hemmung des Stoffwechsels vorliegen als in der übrigen Mundhöhle, vor allem bedingt durch die Bindung von Chlorhexidin an die Plaquematrix; daneben ruft das Absinken des pH-Werts von 7 auf 5 nach Hesselgren (25) bereits eine zehnfache Wirkungsminderung hervor. Daraus folgt, daß sich mit den zur Mundspülung üblichen Konzentrationen sicherlich keine Einstellung der Säurebildung bewirken läßt, wohl aber noch eine Reduktion sowie Bakteriostase.

Entsprechend äußert sich auch A. Davies (9) auf Grund seiner Untersuchungen. Er vermutet, daß ein Kontakt von vielen Stunden notwendig wäre, um überhaupt eine signifikante Zahl der Bakterien innerhalb der Plaque zu töten.

Auch die von G. Bender (1) beobachtete Verminderung besonders des anaeroben Speichelstoffwechsels als Folge regelmäßiger Chlorhexidinspülungen beruht wohl mehr auf einem Absinken der Gesamtzahl der Mikroorganismen durch Bakteriostase als auf einer Hemmung der Säurebildung.

Dennoch ergibt sich abschließend, daß die normalerweise verwendeten Konzentrationen der Chlorhexidin-Spüllösungen auf Grund der Depotwirkung verschiedener Substrate geeignet sind, die Säurebildung von Bakterien der Mundhöhle, vor allem der kariogenen Streptokokken, zumindest für einige Zeit einzudämmen. Dabei ist mit einer möglicherweise geringeren Empfindlichkeit einzelner Streptokokken-Stämme nicht zu rechnen.

Reiht man dieses Ergebnis zwischen bereits bekannte Daten ein, so ergibt sich folgende zusammenfassende Darstellung:

Die plaque- und karieshemmende Wirkung des Chlorhexidins beruht auf dem Zusammenwirken von

- antibakteriellen Eigenschaften
 - daraus folgt: Reduktion der Keimzahl
 - Hemmung der Säurebildung
 - Veränderung der Bakterienoberfläche
- Affinität zu verschiedenen Substraten der Mundhöhle
 - daraus folgt: Depotwirkung
 - Beeinflussung der am Aufbau der Plaques beteiligten Substanzen;

VI. ZUSAMMENFASSUNG

- Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Chlorhexidindiglu-
konat auf die Säurebildung von elf verschiedenen Streptokokkus
mutans-Stämmen wurde mit Hilfe der Warburg-Methode untersucht.
Als Meßgröße diente die von den Säuren aus einem Bicarbonatpuf-
fer stöchiometrisch freigesetzte CO_2 -Menge.
Es ergaben sich folgende Ergebnisse:
 - 1) Die Bildung von CO_2 erfolgte, solange genügend Substrat vorhan-
den war, nahezu konstant über die Zeit. Die Umsatzgeschwindig-
keit variierte jedoch bereits ohne Hemmstoff von Stamm zu
Stamm wie auch innerhalb jedes einzelnen Stammes an verschie-
denen Tagen beträchtlich, hatte aber keinen Einfluß auf die Hem-
mung des Stoffwechsels.
 - 2) Die Empfindlichkeit der elf untersuchten Stämme gegenüber dem
Hemmstoff wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die für ei-
ne 50 %ige Reduktion der Säurebildung notwendige Konzentra-
tion an Chlorhexidin betrug unter den gegebenen Bedingungen
durchschnittlich 19 $\mu\text{g/ml}$.
 - 3) Die Abhängigkeit der Säurebildung von der Konzentration an
Hemmstoff ergab in allen Fällen:
 - keine oder nur geringe Hemmung bis zu einer Schwellenkonzent-
ration (ca. 10 — 15 $\mu\text{g/ml}$)
 - oberhalb der Schwellenkonzentration exponentieller Verlauf
der Hemmkurve (in einigen Fällen zeitabhängig) (ca. 25 — 75
 $\mu\text{g/ml}$).
- Die Ergebnisse zusätzlicher Untersuchungen vier weiterer Bakte-
rienarten und menschlichen Nüchternspeichels, die qualitativ gleich
und quantitativ ähnlich ausfielen, erlaubten den Vergleich der ermit-
telten Daten mit anderen Untersuchungen wie auch den Versuch einer
Übertragung in die Praxis.
 - 1) Zum Mechanismus ergibt sich dann als wahrscheinlich: die ins-
gesamt beobachtete Minderung der Stoffwechselleistung ist zu-
nächst auf eine echte Hemmung des Stoffwechsels jeder einzel-
nen Zelle zurückzuführen und nicht auf ein Absinken der Gesamt-
zahl noch lebender Organismen. Erst höhere Konzentrationen be-
wirken eine irreversible Zellschädigung bzw. den Zelltod.
 - 2) Die nach üblichen Chlorhexidinspülungen in der Mundhöhle er-
reichten Konzentrationen erscheinen in Anbetracht der vorliegen-
den Ergebnisse geeignet, die schädigende Säurebildung karioge-
ner Mikroorganismen zumindest für einige Stunden einzudäm-
men.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 — BENDER G.
Wirkungen von Chlorhexidinspülungen auf den Stoffwechsel von Speichelbakterien
Med. Diss. Erlangen 1978
- 2 — BENTLEY M., DAVIES A., FIELD B. S., ROBERTS W.
zitiert nach (37)
- 3 — BONESVOLL P., LÖKKEN P., RÖLLA G., PAUS P. N.
Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth-rinses
Archs oral Biol. **19**, 209 (1974)
- 4 — BONESVOLL P., LÖKKEN P., RÖLLA G.
Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity
Archs oral Biol. **19**, 1025 (1974)
- 5 — CANCRO L. P., PAULOVICH D. B., KLEIN K., PICOZZI A.
Effects of a chlorhexidine mouthrinse on dental plaque and calculus
J. Periodontol. **43**, 687 (1972)
- 6 — CARLSSON J.
Presence of various types of non-hemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the cavity in man.
Odont. Revy, **18**, 55 (1967)
- 7 — CAWSON R. A., CURSON I.
The effectiveness of some antiseptics on the oral mucous membrane
Brit. dent. J. **106**, 208 (1959)
- 8 — DAVIES A., BENTLEY M., FIELD B. S.
Comparison of the Action of Vantocil, Cetrinide and Chlorhexidine on Escherichia coli and its Spheroplasts and the Proto-plasts of Gram Positive Bacteria
J. appl. Bact. **31**, 448 (1968)
- 9 — DAVIES A.
The mode of action of chlorhexidine
J. periodont. Res. **8**, Suppl. 12, 68 (1973)
- 10 — DAVIES G. E., FRANCIS J., MARTIN A. R., ROSE F. L., SWAIN G.
1 : 6—Di—4'—Chlorophenyldiguanidohexane („Hibitane“) Laboratory Investigations of a new antibacterial Agent of high Potency
Brit. J. Pharmacol. **9**, 192 (1954)
- 11 — DAVIES R. M., HULL P.S.
Plaque inhibition and distribution of chlorhexidine in Beagle dogs

- J. periodont. Res. **8**, Suppl. 12, 22 (1973)
- 12 — EMILSON C. G., ERICSON TH., HEYDEN G., LILJA J.
Effect of chlorhexidine on human oral streptococci
J. periodont. Res. **7**, 189 (1972)
 - 13 — EMILSON C. G., KRASSE B.
Effect of chlorhexidine gels on microorganisms in the plaque
J. dent. Res. **51**, Scand. Div., Suppl. 5, 1308 (1972)
 - 14 — FITZGERALD R. J., COYKENDALL A. L., SHKLAIR I. L.,
COWMAN R. A., JORDAN H. V.
Streptococcus mutans and dental caries
DHEW Pub. No. (NIH) 74 (1973)
 - 15 — FLÖTRA L., GJERMO P., RÖLLA G., WAERHAUG J.
A 4-month study on the effect of chlorhexidine mouthwashes on
50 soldiers
Scand. J. dent. Res. **80**, 10 (1972)
 - 16 — GEHRING F.
Extrazelluläre Polysaccharide bildende Streptokokken aus Zahn-
plaques und ihre Beziehung zur Zahnkaries
Carl Hanser Verlag München 1972
 - 17 — GEHRING F., MÄKINEN K. K., LARMAS M., SCHEININ A.
Turku sugar studies IV
An intermediate report on the differentiation of polysaccharide
forming streptococci (*S. mutans*)
Acta odont. Scand. **32**, 435 (1974)
 - 18 — GEHRING F., KARLE E. J., PATZ J., FELFE W., BRADATSCH U.
Vorkommen von Streptococcus mutans-Varianten bei Mensch
und Versuchstier
Dtsch. zahnärztl. Z. **31**, 18 (1976)
 - 19 — GJERMO P.
Chlorhexidine in dental practice
J. of Clin. Periodontology **1**, 143 (1974)
 - 20 — GJERMO P., BAASTAD K. L., RÖLLA G.
The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds
J. periodont. Res. **5**, 102 (1970)
 - 21 — GUGGENHEIM B.
Streptococci of dental plaques
Caries Res. **2**, 147 (1968)
 - 22 — HAHN, HEESCHEN, TOLLE
„Streptokokkus“ Eine Studie zur Struktur, Biochemie, Kultur und
Klassifizierung
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte Bd. 22 Heft 4
(1970)
 - 23 — HAROLD F. M., BAARDA J. R., BARON C., ABRAMS A.
Dio 9 and Chlorhexidine: Inhibitors of membrane-bound ATP ase

and of cation transport in *Streptococcus faecalis*
Biochem. biophys. Acta **183**, 129 (1969)

- 24 — HENNESSEY T. D.
Some antibacterial properties of chlorhexidine
J. periodont. Res. **8**, Suppl. 12, 61 (1973)
- 25 — HESSELGREN S. G., DAHL G. M., LARJE O.
In vitro experiments with chlorhexidine on pure bacterial and fungal cultures from the mouth
Swed. dent. J. **64**, 801 (1971)
- 26 — HESSELGREN S. G., DAHL G. M., NEDLICH U.
Chlorhexidine as an inhibitor of pure bacterial and fungal cultures from the mouth
Swed. dent. J. **65**, 155 (1972)
- 27 — HIRST R. C.
Chlorhexidine: A review of literature
Periodont. Abstr. XX, No. 2 (1972)
- 28 — HUGO W. B., LONGWORTH A. R.
Some aspects of the mode of action of chlorhexidine
J. Pharm. Pharmacol. **16**, 655 (1964)
- 29 — HUGO W. B., LONGWORTH A. R.
Effect of chlorhexidine diacetate on „protoplasts“ and spheroplasts of *Escherichia coli*, protoplasts of *Bacillus megaterium* and the Gram staining reaction of *Staphylokokkus aureus*
J. Pharm. Pharmacol. **16**, 751 (1964)
- 30 — HUGO W. B., LONGWORTH A. R.
Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine diacetate
J. Pharm. Pharmacol. **17**, 28 (1965)
- 31 — HUGO W. B., LONGWORTH A. R.
The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylokokkus aureus*
J. Pharm. Pharmacol. **18**, 569 (1966)
- 32 — KALOWSKI M., KEDZIA A.
Sensitivity of streptococci producing extracellular mucopolysaccharides from saccharose to the action of chlorhexidine gluconate
Czas. Stomat. XXVIII, **7**, 687 (1975)
- 33 — KOELLE O.
Manometrie
B. Braun Apparatebau Messungen
- 34 — LAWRENCE C. A.
Antimicrobial activity in vitro of Chlorhexidine
J. Amer. Pharm. Ass. Sci. **49**, 731 (1960)

- 35 — LÖE H.
Does chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases?
J. periodont. Res. **8**, Suppl. 12, 93 (1973)
- 36 — LÖE H., SCHIÖTT C. R.
The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaques and gingivitis in man
J. periodont. Res. **5**, 79 (1970)
- 37 — LONGWORTH A. R.
Chlorhexidine
in: „The Inhibition and Destruction of the Microbial Cell“
W. B. Hugo (Ed.) New York 1971
- 38 — LUOMA H.
The effects of chlorhexidine and fluoride combinations on the potassium, sodium and phosphorus content and acid production of cariogenic streptococci
Archs oral Biol. **17**, 1431 (1972)
- 39 — MOLL C. P.
Quantitative enzymatische Bestimmung des Glucoseabbaus und der Milchsäurebildung durch isolierte Plaque-Streptokokken
Med. Diss. Erlangen 1970
- 40 — NEIDERS M. E., WEISS L.
The effects of chlorhexidine on cell detachment in vitro
Archs oral Biol. **17**, 961 (1972)
- 41 — OCHSENBEIN H.
Chlorhexidin in der Zahnheilkunde — eine Literaturübersicht
Acta parodont., in Schweiz. Mschr. Zahnheilk. **83**, 113 (1973)
- 42 — OCHSENBEIN H.
Chlorhexidin in der Zahnheilkunde — Fortsetzung einer Literaturübersicht
Acta parodont., in Schweiz. Mschr. Zahnheilk. **83**, 819 (1973)
- 43 — OCHSENBEIN H.
Chlorhexidin in der Zahnheilkunde — Aktueller Stand der Forschung
Acta parodont., in Schweiz. Mschr. Zahnheilk. **84**, 459 (1974)
- 44 — RANKE E., RANKE B.
Zur Bedeutung verschiedener Plaque-Streptokokken für die Karies
Dtsch. zahnärztl. Z. **25**, 270 (1970)
- 45 — RÖLLA G., LÖE H., SCHIÖTT C. R.
Retention of chlorhexidine in the human oral cavity
Archs oral Biol. **16**, 1109 (1971)

- 46 — RÖLLA G., MELSEN B.
On the mechanism of the plaques inhibition by chlorhexidine
J. dent. Res. **54**, Spec. No. B 57 (1975)
- 47 — SAUERWEIN E.
Kariologie
2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1972
- 48 — SCHIÖTT R. C., LÖE H., JENSEN S. B., KILIAN M., DAVIES R. M., GLAVIND K.
The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora
J. periodont. Res. **5**, 84 (1970)
- 49 — SCHIÖTT C. R., LÖE H.
The sensitivity of oral streptococci to chlorhexidine
J. periodont. Res. **7**, 192 (1972)
- 50 — SCHIÖTT C. R.
Effect of chlorhexidine on the microflora of the oral cavity
J. periodont. Res. **8**, Suppl. 12, 7 (1973)
- 51 — SCHIÖTT C. R., BRINER W. W., LÖE H.
Two years oral use of chlorhexidine in man
II. The effect on the salivary bacterial flora
J. periodont. Res. **11**, 145 (1976)
- 52 — SCHIÖTT C. R., BRINER W. W., KIRKLAND J. J., LÖE H.
Two years oral use of chlorhexidine in man
III. Changes in the sensitivity of the salivary flora
J. periodont. Res. **11**, 153 (1976)
- 53 — SCHLEGEL H. G.
Allgemeine Mikrobiologie
4. Aufl., Goerg Thieme Verlag, Stuttgart 1976
- 54 — SCHMID F.
Das Wachstumsverhalten kariogener Streptokokken auf Glucosenährböden
Med. Diss. Erlangen 1974
- 55 — SCHÖDEL
in Firma blend-a-med Forschung Mainz
Persönliche Mitteilung 4. 8. 77
- 56 — SCHROEDER H. E.
Quantitative In-Vivo-Studie mit Zahnsteinhemmstoffen
Schweiz. Mschr. Zahnheilk. **72**, 294, 399 (1962)
- 57 — SYMPOSIUM ON CHLORHEXIDINE IN THE PROPHYLAXIS OF DENTAL DISEASES Gothenburg, Sweden September 15 — 16, 1972
J. periodont. Res. **8**, Suppl. 12 (1973)
- 58 — UMBREIT W. W., BURRIS R. H., STAUFFER J. F.
Manometric techniques
4th ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis 1964

VIII. ANHANG

1. TABELLEN UND GRAFIKEN

Stamm	serolog. Eingruppierung	Dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von
626 634 638 249	Serotyp a b e serolog. nicht eingruppierbar	Lehrstuhl für Experimentelle Zahnmedizin der Uni Würzburg Sonderforschungsbereich Biologie der Mundhöhle Prof. Dr. F. Gehring
C2/21 T3/52 T3/53 T5/13 T3/67 441 (= NCTC 10449)	„Sero“-Biotyp a b c d e Serotyp c	siehe oben (näheres bei Gehring et al. 1974 „Turku sugar studies“ (17))
C67/1 (ähnlich NCTC 10449)		Department of Preventive Dentistry Laboratory of Microbiology — University of Utrecht Prof. Dr. J. D. Stoppelaar

Tab. 6 Aufstellung der verwendeten Streptokokkus mutans-Stämme

Art	Eigenschaften	Dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von
Strept. sal.	S-Form, leimtropfenartiges Wachstum (= Lävän)	Prof. Dr. F. Gehring (siehe Tab. 6)
E. coli Staph. aureus Cand. albicans	Normstämme	Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität Erlangen-Nürnberg Prof. Dr. Dr. Gräf

Tab. 7 Aufstellung der weiteren verwendeten Mikroorganismen

Abb. 11 — 21

Mittlere prozentuale Hemmung in Abhängigkeit von der Konzentration an Hemmstoff = „Hemmkurven“ für sämtliche Durchgänge der elf untersuchten Strep. mutans-Stämme

- I. Durchgang
- II. Durchgang
- III. Durchgang

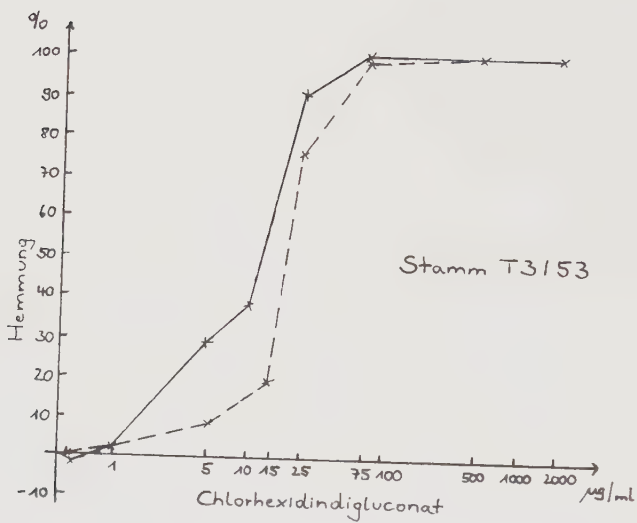


Abb. 11

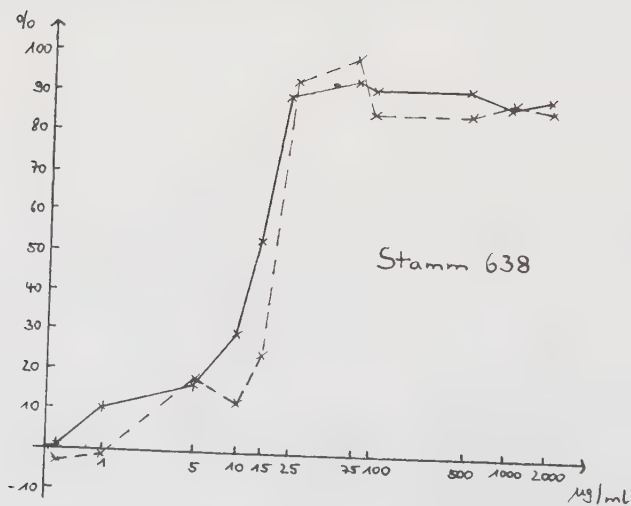


Abb. 12

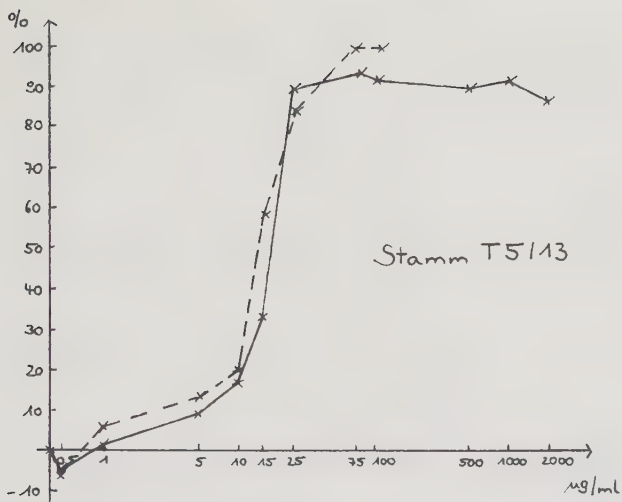


Abb. 13

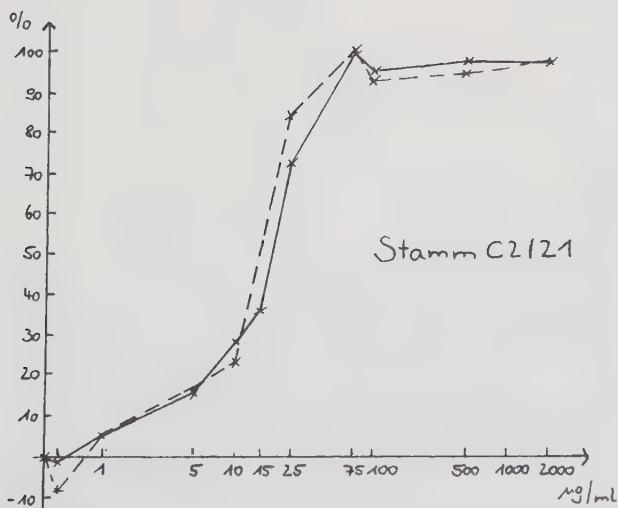


Abb. 14

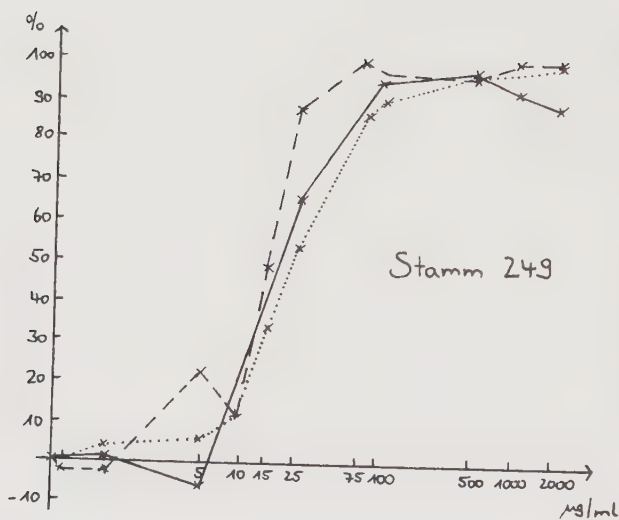


Abb. 15

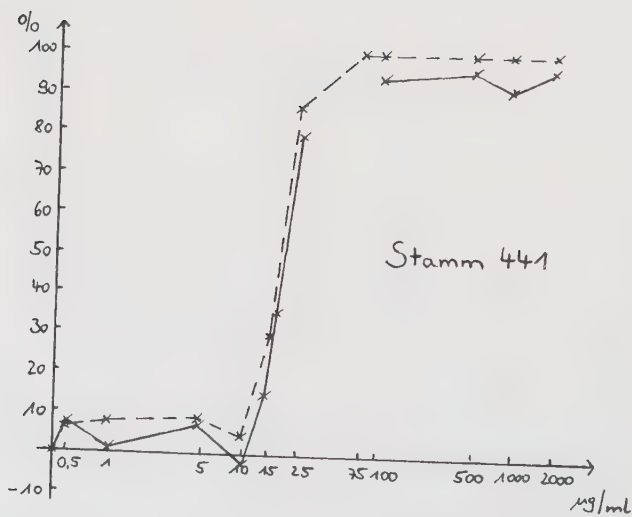


Abb. 16

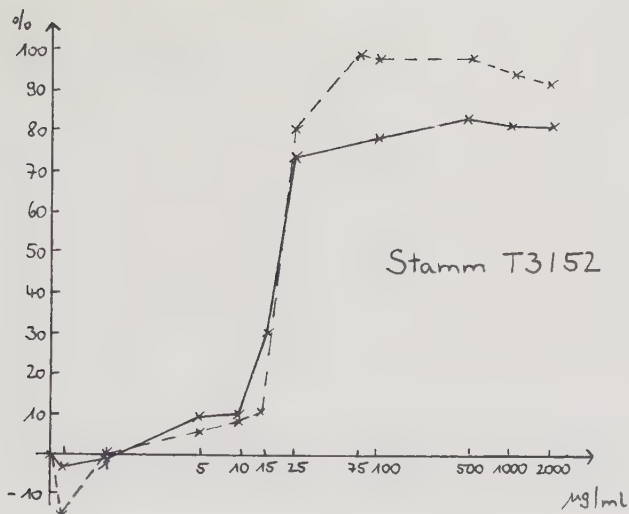


Abb. 17

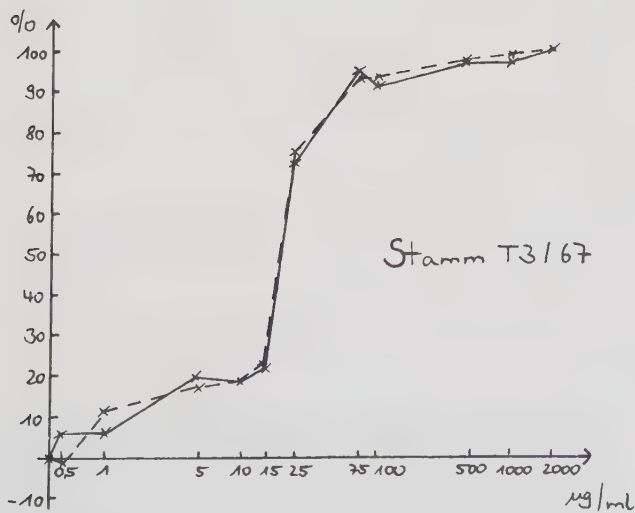


Abb. 18

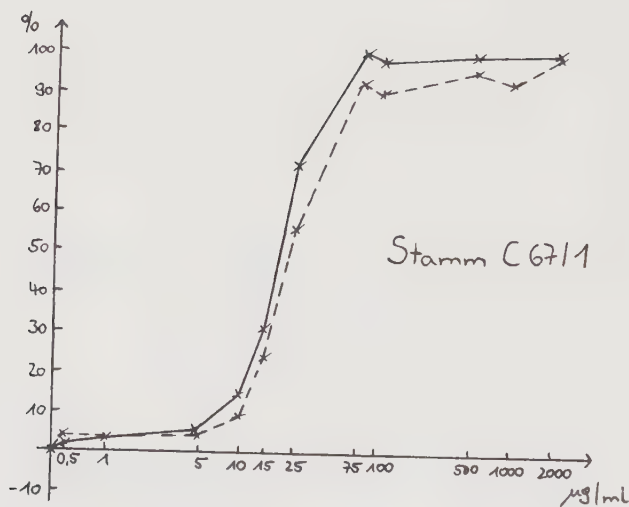


Abb. 19

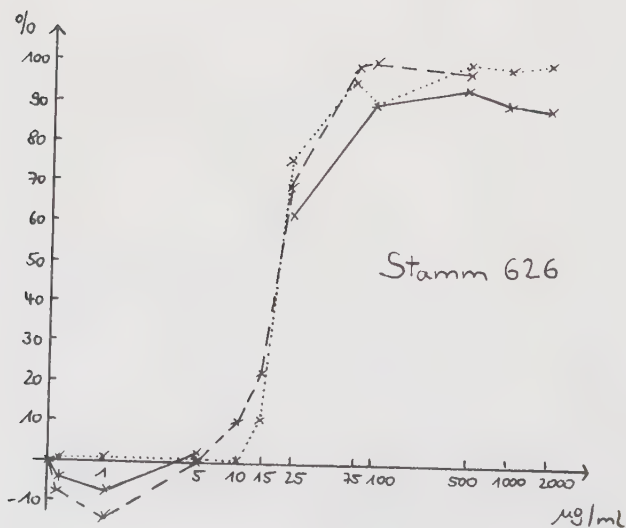


Abb. 20

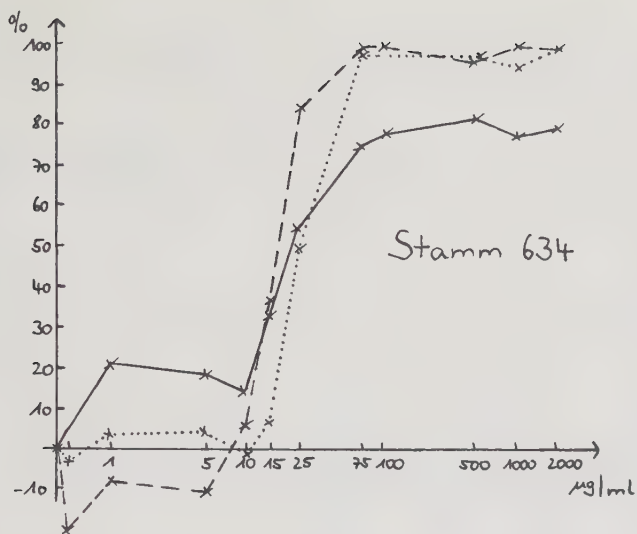


Abb. 21

Tab. 8 a — c und 9

Die aus den Hemmkurven der einzelnen Durchgänge graphisch ermittelten Werte für 25, 50 und 75 %ige Stoffwechselhemmung;

(Werte auf 0,5 abgerundet;

Reihenfolge entsprechend der Mittelwerte für 50 %ige Hemmung;

Zahlen in Klammern: zur Mittelwertsberechnung nicht herangezogene Werte, da nicht mehr im linearen Bereich der Hemmkurve)

Stamm	I. Durchg.	II. Durchg.	III. Durchg.	Mittelwert
T3/53	4,0	16,5	12,5	9,0
638	7,5	15,0		11,0
T5/13	12,5	10,5		11,5
C2/21	9,0	10,5		10,0
249	10,0	11,5		11,0
441	16,5	14,5		15,5
T3/52	12,5	17,5		15,0
T3/67	15,5	15,0		15,0
C67/1	13,0	16,0	17,0	14,5
626	11,0	16,0		14,5
634	12,5	12,5	19,0	14,5
Mittelwert aller Durchgänge				13,0

Tab. 8 a Die für 25 %ige Stoffwechselhemmung notwendigen Konzentrationen an Chlorhexidin in $\mu\text{g/ml}$ (*Streptokokkus mutans*)

Stamm	I. Durchg.	II. Durchg.	III. Durchg.	Mittelwert
T3/53	12,5	20,5	23,0	15,5
638	14,5	18,0		16,0
T5/13	18,0	14,5		16,0
C2/21	18,0	15,0		16,5
249	18,0	15,0		18,5
441	20,0	18,5		19,0
T3/52	18,0	20,5		19,0
T3/67	19,5	19,5		19,5
C67/1	19,0	23,0	21,0	21,0
626	23,0	23,0		22,0
634	23,0	17,5	25,0	22,0
Mittelwert aller Durchgänge				19,0

Tab. 8 b Die für 50 %ige Stoffwechselhemmung notwendigen Konzentrationen an Chlorhexidin in $\mu\text{g/ml}$ (*Streptokokkus mutans*)

Stamm	I. Durchg.	II. Durchg.	III. Durchg.	Mittelwert
T3/53	19,0	25,0		22,0
638	21,0	22,0		21,5
T5/13	22,5	21,5		22,0
C2/21	26,0	22,5		24,0
249	38,0	21,0	50,0	36,0
441	24,0	23,0		23,5
T3/52	22,0	24,0		23,0
T3/67	20,0	25,0		22,5
C67/1	28,0	43,5		36,0
626	(66)	40,0	25,0	32,5
634	(69)	22,0	44,0	33,0
Mittelwert aller Durchgänge				27,0

Tab. 8 c Die für 75 %ige Stoffwechselhemmung notwendigen Konzentrationen an Chlorhexidin in $\mu\text{g/ml}$ (*Streptokokkus mutans*)

Abb. 22 — 26

Mittlere prozentuale Hemmung in Abhängigkeit von der Konzentration an Chlorhexidin = „Hemmkurven“ für die vier weiteren untersuchten Mikroorganismenarten und den Speichel

- I. Durchgang
- II. Durchgang
- III. Durchgang

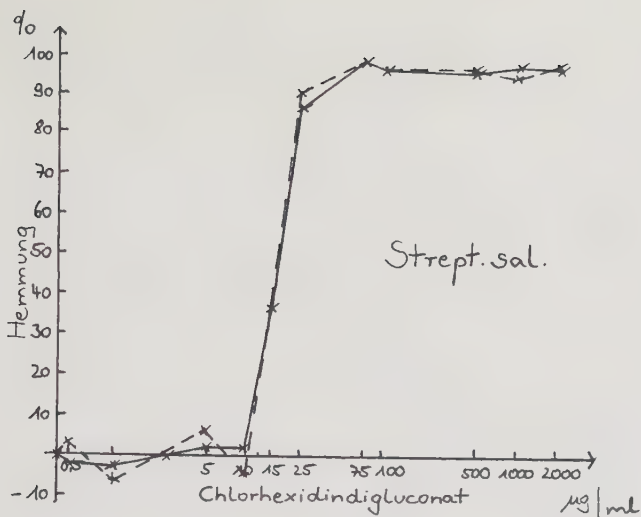


Abb. 22

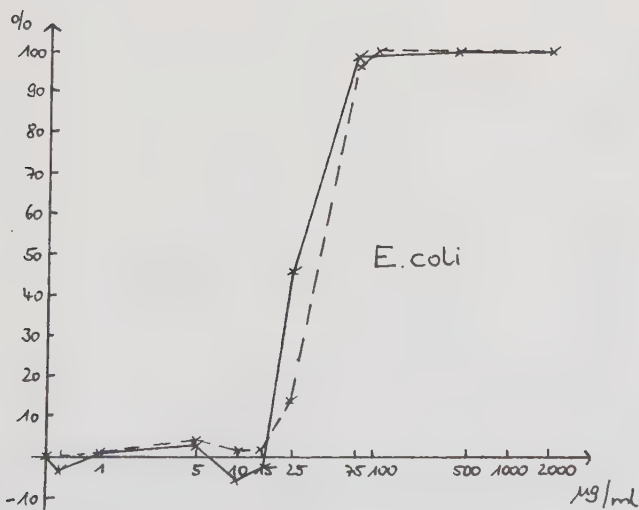


Abb. 23

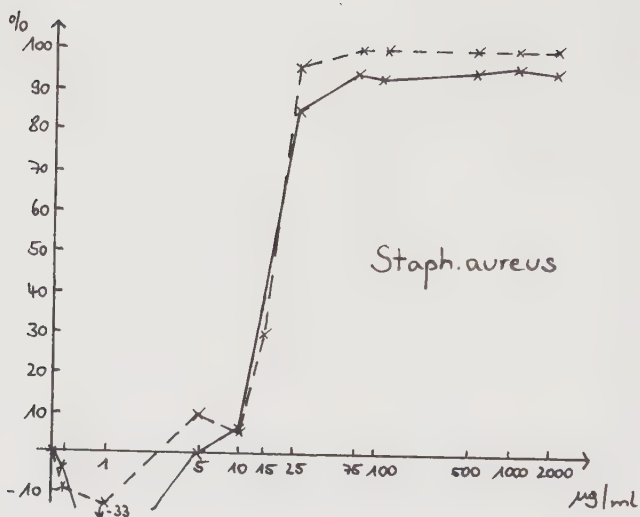


Abb. 24

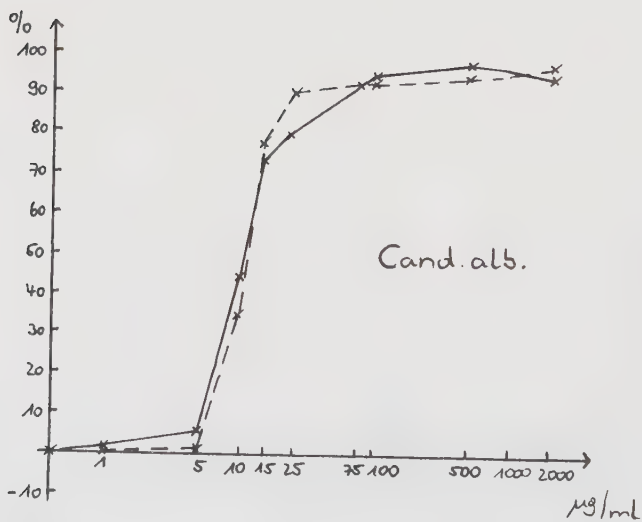


Abb. 25

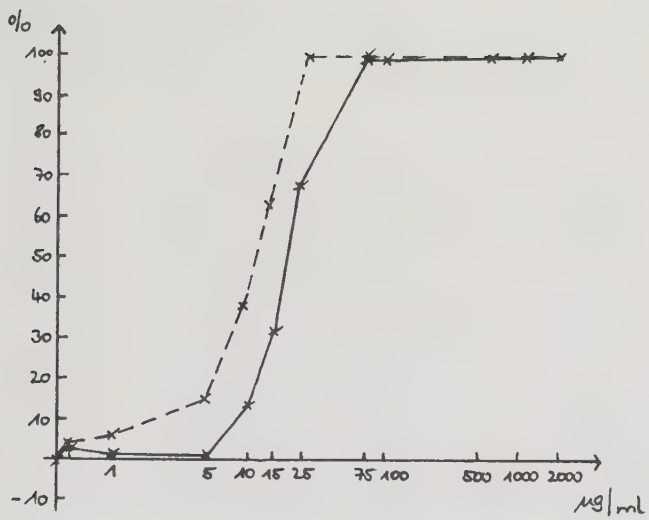


Abb. 26

Art	I. Durchg.	II. Durchg.	Mittelwert
25 %ige Hemmung			
Strep. sal.	13,0	13,5	13,25
E. coli	20,0	29,0	24,5
Staph. aureus	12,5	14,0	13,25
Cand. albicans	7,0	8,5	7,75
Speichel	14,0	6,5	10,25
Strep. mutans	Gesamtmittelwert		13,0
50 %ige Hemmung			
Strep. sal.	17,5	17,5	17,5
E. coli	27,5	40,0	33,75
Staph. aureus	17,5	17,5	17,5
Cand. albicans	11,0	12,0	11,5
Speichel	20,0	11,5	15,75
Strep. mutans	Gesamtmittelwert		19,0
75 %ige Hemmung			
Strep. sal.	22,5	22,0	22,25
E. coli	46,0	55,0	50,5
Staph. aureus	23,0	21,5	22,25
Cand. albicans	16,0	15,0	15,5
Speichel	32,0	17,0	24,5
Strep. mutans	Gesamtmittelwert		27,0

Tab. 9 Die für 25, 50 und 75 %ige Stoffwechselhemmung der weiteren untersuchten Mikroorganismen notwendigen Konzentrationen an Chlorhexidin (in $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu den Mittelwerten sämtlicher Durchgänge von Strep. mutans

Ansatz:

Strept. mutans
441
I. Durchg.

Datum: 22.8.77
Beginn: 12¹⁰ Ende: 1

63

Art / Stamm : Strept. mut. 441 I. Durchg. Datum : 22.8.77

Konz. Chlk. [µg/ml]	prozentuale 30'	Stoffwechselhemmung nach: 60' 120' 180' Mittelwert			pH nach Versuch	Bemerkungen
0	0	0 0 0	0		6,67	
0,5	9	7 5 7	7		6,68	
1	-2	0 2 2	0,5		6,71	
5	11	6 4 7	7		6,61	
10	-14	-5 1 6	-3		6,70	
15	5	11 19 27	15,5		6,86	
25	70	79 80 87	79		7,17	
75						Manometer verstopft!
100	89	93 96 97	94		7,19	
500	91	95 97 98	95		7,23	
1000	84	91 94 97	91		7,33	
2000	89	96 97 98	95		7,23	

3. AUFSTELLUNG DER VERWENDETEN GERÄTE

Warburg-Apparat V 166
B. Braun Melsungen

Photometer PMQ II mit Filter M 4 Q III
Carl Zeiss

Digital pH-Meter model 701
Orion Research

Digitale Analysenwaage 2400
Sartorius

Minifuge
Heraeus Christ

Gas Pak — System
Becton, Dickinson and Company

4. STRUKTURFORMEL CHLORHEXIDIN



1,6-Di-4'-Chlorophenyldiguanidohexan
= Chlorhexidin

Herrn Prof. Dr. Adolf Kröncke danke ich für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Anregungen und besonders für die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bei der Lösung der verschiedenen wissenschaftlichen und technischen Probleme, die während der Bearbeitung des Stoffes auf mich zukamen. Ich bedanke mich außerdem, daß er mir ermöglichte, im biochemischen Labor der Klinik und Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie arbeiten zu können.

Herrn Dr. Distler und Frau Degeorgio sage ich Dank für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

LEBENS LAUF

Geboren am 20. Dezember 1954 in Coburg als einziges Kind des Zahnarztes Dr. Helmut Probst und der Geschäftsfrau Brigitte Probst geb. Lunz;

von Mai 1961 bis Juli 1964 Besuch der Volksschule in Neustadt bei Coburg;

anschließend Übergang in das Arnold-Gymnasium Neustadt bei Coburg (math. naturwissenschaftl. Gymnasium); Abschluß am 8. Juni 1973 mit dem Abitur;

von Oktober 1973 bis Juli 1978 Studium der Zahnheilkunde an der Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg;

seit April 1978 verheiratet mit dem Ingenieur-Geologen Ruprecht Steinmann;

Staatsexamen vom August 1978 bis Dezember 1978;

Approbation als Zahnärztin am 11. 12. 1978;

EMIL PATZSCHKE

GmbH & Co KG

GRAFISCHER BETRIEB

8632 Neustadt b. Coburg

Tel. 09568/5432 u. 5436